

Untersuchungen zur Bildung des Endoplasmatischen Reticulum und der Kernhülle

D i s s e r t a t i o n



zur Erlangung des akademischen Grades
d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m
im Promotionsfach Biologie
Spezialisierung Zellbiologie

eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Institut für Biologie der Humboldt-Universität zu Berlin

von
Diplom-Biochemiker Lars Dreier
geboren am 16. Januar 1968 in Bremervörde

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin	Prof. Dr. Dr. h.c. H. Meyer
Dekan der Fakultät	Prof. Dr. J. Rabe

Gutachter:	1.	Prof. Dr. Tom A. Rapoport, Boston
	2.	Prof. Dr. Enno Hartmann, Göttingen
	3.	Prof. Dr. Harald Saumweber, Berlin

Tag der mündlichen Prüfung: 6. Juli 1998

ABSTRACT

Membrane-bound organelles form amazingly elaborate structures in eucaryotic cells. For instance, the endoplasmic reticulum (ER) forms a network of membrane tubules and flattened cisternae.

We have investigated the mechanisms involved in this process by establishing an *in vitro* system that reconstitutes the formation of membrane tubules and membrane networks of the ER. It uses an extract of the eggs of *X.laevis*. In this system the membrane tubules are formed by the fusion of small membrane vesicles. Cytosol is not required for the fusion but for the formation of the membrane tubules and networks. In the absence of cytosol fusion of the small membrane vesicles simply results in the formation of large spherical membrane vesicles.

It is generally believed that microtubules and microtubule motor proteins are essential for the formation of the membrane networks of the ER. Interestingly, in our *in vitro* system microtubules are not involved in this process since the addition of inhibitors of microtubule formation or depletion of tubulin from the cytosol has no effect. This suggests that microtubule-independent mechanisms for the formation of the membrane network of the ER exist. The identification of cytosolic factors needed for this process will help to reveal these mechanisms.

The nuclear envelope has some similarity to the flattened cisternae of the ER and the Golgi-apparatus. A cell-free system for the formation of nuclei was established that uses the same egg extract as for the formation of the ER. To specifically study the steps in the formation of the nuclear envelope, we developed a simplified system that allowed the observation of a novel step in this process: The flattening of the chromatin-bound membrane vesicles on the chromatin surface. A cytosolic activity is required for this process. Without cytosol nuclear membrane vesicles can still bind to the chromatin and fuse with each other, but this fusion results only in the formation of bigger, spherical membrane vesicles that do not flatten on the chromatin surface.

The identification of cytosolic factors involved in the flattening of the nuclear envelope and the formation of the membrane tubules of the ER should help to understand the

underlying mechanisms and thereby reveal if similar mechanisms are responsible for the formation of similar membrane structures in the eukaryotic cell.

ZUSAMMENFASSUNG

Das Endoplasmatische Reticulum (ER) bildet ein ausgedehntes Netzwerk aus Membrantubuli und abgeflachten Zisternen in der eukaryontischen Zelle. In dieser Arbeit wurde unter Verwendung eines Extraktes der Eier von *Xenopus laevis* ein *in vitro* System zur Bildung der polygonalen Membrannetzwerke des ER entwickelt. In diesem System wurde zum ersten Mal eine Mikrotubuli-unabhängige Bildung der Membrannetzwerke des ER demonstriert und damit die Existenz Mikrotubuli-unabhängiger Mechanismen für ihre Bildung. Die Membrantubuli entstehen durch die Fusion kleiner Membranvesikel miteinander. Diese Fusion allein, die unabhängig von Cytosol ist, ist jedoch nicht ausreichend, da durch die Fusion in Abwesenheit von Cytosol lediglich große, kugelförmige Membranvesikel entstehen. Vielmehr ist eine unbekannte cytosolische Aktivität notwendig, damit die Fusion zur Bildung von Membrantubuli und Netzwerken führt. Mit dem *in vitro* System wurde die Voraussetzung für die Identifizierung dieser Mikrotubuli-unabhängigen, cytosolischen Aktivität geschaffen.

Das Verhalten des ER *in vitro* ähnelt dem des ER in Zellen. Werden Zellen mit Calcium-Ionophoren behandelt, so deassembliert das ER, während *in vitro* die Bildung des ER durch hohe Konzentrationen von Ca^{2+} verhindert wird. In der Mitose deassembliert das ER in Abhängigkeit vom Zelltyp zu einem unterschiedlichen Ausmaß. Analog wird das ER *in vitro* zu einem unterschiedlichem Ausmaß gebildet, abhängig von der Art, in der die zugegebenen mitotischen Cytosole hergestellt wurden.

Die Kernhülle hat Ähnlichkeit mit den abgeflachten Zisternen des ER und des Golgi-Apparates. In dieser Arbeit wurde die Bildung des Zellkerns in einem zellfreien System etabliert, das den für die ER-Bildung eingesetzten Extrakt verwendet. Einzelne Phasen bei der Bildung der Kernhülle wurden in einem vereinfachten Kernbildungssystem untersucht. Dabei wurde ein neuer Schritt in diesem Prozeß entdeckt: Das Abflachen von Chromatin-gebundenen Membranvesikeln auf der Oberfläche des Chromatins. Die hierfür verantwortliche Aktivität befindet sich in der cytosolischen Fraktion. Ohne Cytosol binden die Kernmembranvesikel an das Chromatin und fusionieren miteinander, die resultierenden großen Membranvesikel bleiben jedoch kugelförmig, flachen nicht ab und können keine Kernhülle bilden.

Die Identifizierung der cytosolischen Faktoren, die an dem Abflachen der Membranen bei der Bildung der Kernhülle und der Bildung der Membrantubuli des ER beteiligt sind, sollte Hinweise auf die zugrunde liegenden Mechanismen geben und zeigen, ob verwandte Mechanismen an der Bildung ähnlicher Membranstrukturen in der eukaryontischen Zelle beteiligt sind.

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG.....	1
1.1. Struktur und Funktion des ER und des Golgi-Apparates	3
1.2. Fusion von Membranvesikeln des ER und des Golgi-Apparates.....	4
1.3. Beteiligung von Cytoskelettstrukturen an der Lokalisation und Bildung des ER und des Golgi-Apparates in der Zelle	6
1.4. Bildung von Zellkernen im <i>Xenopus in vitro</i> System	8
1.4.1. Dekondensation des Chromatins	9
1.4.2. Bindung von Membranvesikeln an das dekondensierte Chromatin	10
1.4.3. Fusion der Chromatin-gebundenen Membranvesikel.....	13
1.4.4. Die Kernlamina.....	14
1.4.5. Deassemblierung des Zellkerns	15
1.5. Projektbeschreibung	17
 2. MATERIAL UND METHODEN.....	 19
2.1. Herstellung des Eiextraktes.....	19
2.2. Herstellung von Membranfraktionen und Cytosol aus dem Eiextrakt.....	20
2.3. Herstellung von meiotischen Membranen und Cytosol	20
2.4. Herstellung von mitotischem Extrakt sowie mitotischen Membranen und Cytosol	21
2.5. Bestimmung der Histon H1-Kinaseaktivität.....	21
2.6. Präparation von Spermien-Chromatin	22
2.7. Bildung von Zellkernen im <i>Xenopus in vitro</i> System	23
2.8. Bindung von Membranvesikeln an das dekondensierte Chromatin	24
2.9. ER-Bildung im <i>Xenopus in vitro</i> System.....	24
2.10. Manipulationen der ER-Bildung.....	25
2.11. Tubulin-Depletion des Cytosols	26
2.12. Immunfluoreszenz-Mikroskopie.....	27
2.13. Elektronenmikroskopie	27
2.14. SDS-PAGE und Westernblot.....	28
2.15. Fraktionierung des Cytosols.....	29
 3. ERGEBNISSE.....	 30
3.1. Ein neuer Schritt bei der Bildung der Zellkernhülle.....	30
3.1.1. Zellkernbildung im <i>Xenopus</i> Eiextrakt	30
3.1.2. Fraktionierung des Eiextraktes in Cytosol und Membranfraktionen	32
3.1.3. Ein vereinfachtes <i>in vitro</i> System der Zellkernbildung	34
3.1.4. Ein neuer Schritt bei der Bildung der Kernhülle.....	39
3.1.5. Erste Fraktionierung der für das Abflachen der Kernhülle notwendigen	

cytosolischen Aktivitäten	45
3.2. Die Bildung des Endoplasmatischen Reticulums <i>in vitro</i>	46
3.2.1. Ein <i>in vitro</i> System zur Bildung polygoner Membrannetzwerke	46
3.2.2. ER-Membranen sind Bestandteil der polygonen Membrannetzwerke.....	51
3.2.3. Charakterisierung der ER-Bildung <i>in vitro</i>	54
3.2.4. Ca^{2+} verhindert die ER-Bildung <i>in vitro</i>	58
3.2.5. ER-Bildung unter mitotischen Bedingungen.....	58
3.2.6. Die <i>in vitro</i> Bildung des ER ist unabhängig von Mikrotubuli und Actinfilamenten.....	66
3.2.7. Für die Aufrechterhaltung der Struktur der Membrantubuli ist eine Protease- sensitive Komponente notwendig.....	70
3.2.8. Erste Fraktionierungen der für die ER-Bildung notwendigen cytosolischen Aktivitäten.....	72
 4. DISKUSSION	75
 5. LITERATURVERZEICHNIS	86
 6. ANHANG	96
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	96
ERKLÄRUNG.....	97
LEBENS LAUF.....	98
VERÖFFENTLICHUNGEN.....	99
DANKSAGUNG	100

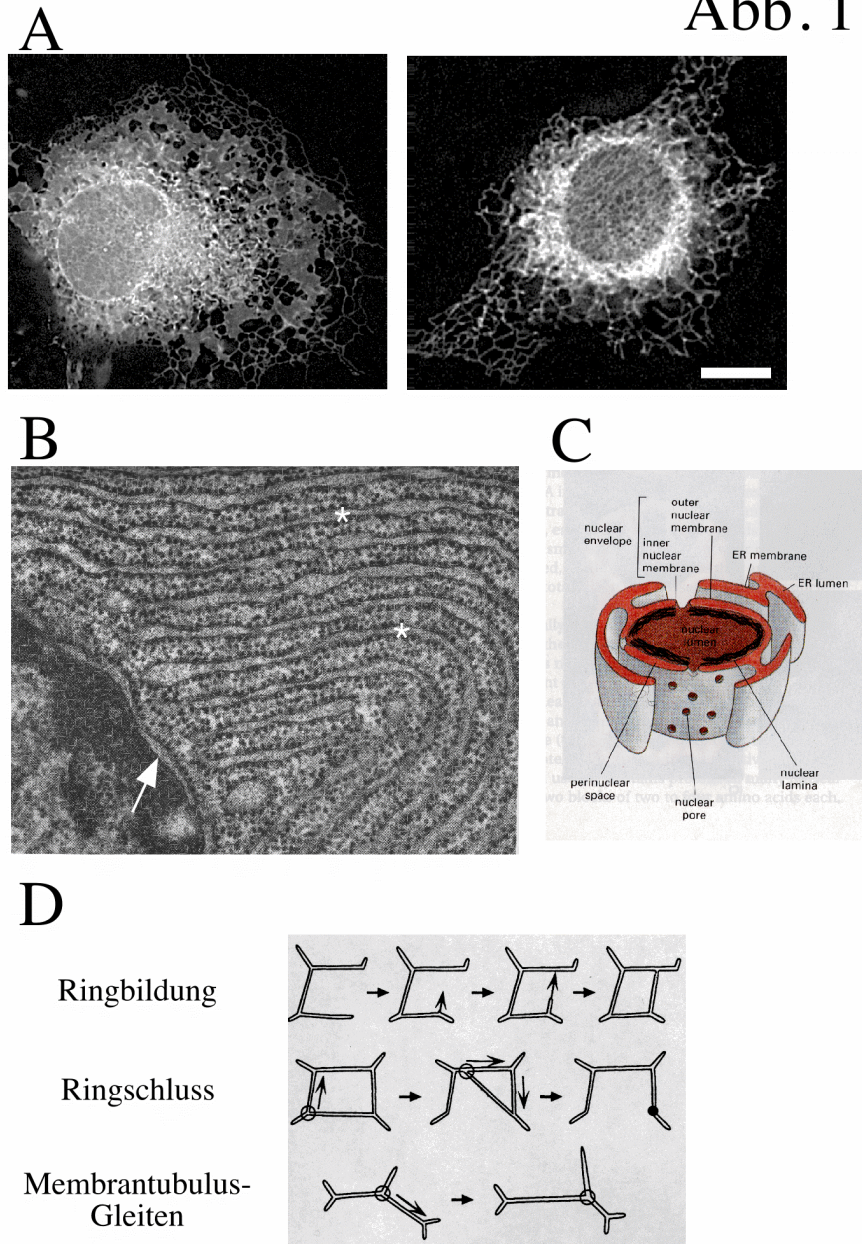
1. EINLEITUNG

Die membranumschlossenen Organellen der eukaryontischen Zelle bilden sehr charakteristische Strukturen. Das Endoplasmatische Reticulum (ER) formt ein zusammenhängendes Netzwerk aus Membrantubuli und abgeflachten Membranzisternen, das mit der Unterstützung des Cytoskeletts in der gesamten Zelle verteilt ist (Abb. 1A). Die polygonalen Membrannetzwerke befinden sich vor allem in der Peripherie der Zelle. Der Zellkern ist von einer inneren und einer äußeren Kernmembran umhüllt. Die äußere Kernmembran ist kontinuierlich mit der ER-Membran. Der Abstand von innerer und äußerer Kernmembran sowie die "Dicke" der abgeflachten Membranzisternen des ER sind in elektronenmikroskopischen Bildern relativ gleichmäßig, und liegen zwischen 30nm und 70nm (Abb. 1B). Die Kernhülle kann daher auch als eine besondere Form einer abgeflachten Membranzisterne betrachtet werden (Abb. 1C). Der Golgi-Apparat besteht ebenfalls aus abgeflachten Membranzisternen, die als Stapel um das Centrosom der Zelle orientiert sind. An den Übergängen des Golgi-Apparates zu den anderen Kompartimenten der Zelle bilden tubuläre und vesikuläre Membranstrukturen das Cis- und Trans-Golgi-Netzwerk.

Die membranumschlossenen Organellen sind dynamische Strukturen, deren Deassemblierung und Bildung gut während der Mitose beobachtet werden kann. In vielen Zellen zerfallen der Golgi-Apparat und das ER zu Beginn der Mitose in Membranvesikel, die am Ende der Mitose miteinander fusionieren und wieder Membranzisternen und -tubuli bilden (Warren, 1993). Die Deassemblierung und die zufällige Verteilung der Vesikel in der Mitose stellen auf einfache Art sicher, daß beide Tochterzellen einen Anteil der jeweiligen Organellen erhalten. Sowohl für das ER als auch für den Golgi-Apparat ist das Ausmaß der Deassemblierung abhängig vom Zelltyp (Warren, 1993; Stanley et al., 1997). In einigen Zellkulturzellen bleibt die netzwerkartige Struktur des ER in der Mitose nahezu vollständig erhalten. In diesem Fall wird das ER bei der Zellteilung wahrscheinlich als Netzwerk auf die beiden Tochterzellen verteilt (Yang et al., 1997; Ellenberg et al., 1997). Auch die Hülle des Zellkerns deassembliert in der Mitose. Es wird eine mehr oder weniger starke, wahrscheinlich vom Verhalten des ER abhängige, Fragmentierung der Kernhülle

beobachtet (Warren, 1993). Bleibt das ER während der Mitose intakt, so verteilt sich die Kernhülle in das Membrannetzwerk des ER (Yang et al., 1997; Ellenberg et al., 1997). Am Ende der Mitose reassembliert die Kernhülle, indem die Vesikel der Kernmembran oder die Membrantubuli des intakt gebliebenen ER mit Hilfe von Chromatin-bindenden Proteinen der inneren Kernmembran an die aufgeteilten Chromosomen binden (Ellenberg et al., 1997;

Abb. 1

**Abb. 1.** Die Struktur des ER und der Kernhülle

(A) Das ER von BHK (baby hamster kidney)-Zellen wurde durch die Expression eines Fusionsproteins aus einem ER-Protein mit dem "Grün fluoreszierenden Protein" (GFP) markiert, und im Fluoreszenz-Mikroskop beobachtet. Die Bilder wurden freundlicherweise von Melissa Rolls und Pascal Stein zur Verfügung gestellt. Maßstab: 10µm.

(B) Das EM-Bild zeigt Zisternen des ER und die Kernhülle einer Pankreaszelle nach Dünnschnitt und Negativkontrastierung. Sterne markieren die Zisternen des ER, der Pfeil markiert die Kernhülle. Auf der Membran des ER und der äußeren Kernmembran sind viele Ribosomen zu sehen. Auffällig ist die gleichmäßige Dicke der ER-Zisternen und der Kernhülle.

(C) Schematische Darstellung der Zisternen des ER und der Kernhülle, die verdeutlicht, daß die Kernhülle als besondere Form einer abgeflachten Membranzisterne angesehen werden kann. (B) und (C) aus Alberts et al., 1994.

(D) Schematische Darstellung der Vorgänge, die bei der Beobachtung des ER in Zellen unterschieden werden können und die Bildung der polygonalen Membrannetze des ER erklären. Nähere Erklärungen im Text (aus Wilson und Wiese, 1996).

Wiese und Wilson, 1993). Die Fusion der Chromatin-gebundenen Membranvesikel oder Membrantubuli führt danach zur Bildung einer kompletten Kernhülle.

Auch in der Interphase ist das ER ein sehr dynamisches Kompartiment, dessen Bildung in lebenden Zellen in Zellkultur mit Hilfe eines hydrophoben, fluoreszierenden Farbstoffes, der relativ spezifisch die ER-Membranen anfärbt, untersucht wurde (Lee und Chen, 1988). Dabei wurden drei Vorgänge unterschieden, die die Bildung der polygonen Membrannetzwerke in der Peripherie der Zelle erklären können (Abb. 1D): 1. Von einem vorhandenen Membrantubulus kann ein neuer abzweigen, länger werden und mit einem anderen Membrantubulus fusionieren. Dieser Vorgang führt zur Bildung neuer Polygone (Ringbildung). 2. Ein Knotenpunkt, an dem drei Membrantubuli zusammentreffen, kann sich relativ zum Rest des Netzwerkes verschieben (Membrantubulus-Gleiten). 3. Durch solch eine Bewegung kann ein Polygon verschwinden (Ringschluß). Die Deassemblierung und Reassemblierung des ER in der Interphase des Zellzyklus könnte zum Beispiel notwendig sein, wenn die Zelle bei der Zellwanderung ihre Form verändert.

Im folgenden werden die Bildung des ER und des Golgi-Apparates einerseits und die Bildung des Zellkerns andererseits näher beschrieben. Während die Funktionen, die diese Organellen wahrnehmen, relativ gut verstanden sind, sind die Mechanismen für die Bildung dieser charakteristischen Membranstrukturen der eukaryontischen Zelle noch weitgehend unbekannt.

1.1. Struktur und Funktion des ER und des Golgi-Apparates

Die charakteristische Struktur des ER könnte durch seine Funktion in der Zelle begründet sein. Sekretorische Proteine müssen während oder nach Beendigung ihrer Translation zum ER gelangen und durch dessen Membran transportiert werden. Durch die gleichmäßige Verteilung des ER in der gesamten Zelle hat jedes neu translatierte Protein ER-Membranen in seiner Nähe und kann diese schnell erreichen. Aufgrund seiner netzwerkartigen Struktur hat das ER eine große Oberfläche und kann viele Bindungs- und

Transportstellen für sekretorische Proteine zur Verfügung stellen. Nachdem ein Protein durch die Membran des ER transportiert worden ist, wird es im Lumen gefaltet und kann zu Proteinkomplexen assembliert werden. Oft werden Proteine durch das Anhängen von Oligosacchariden und die Bildung von Disulfidbrücken modifiziert. Diese Reaktionen laufen um so schneller ab, je konzentrierter die beteiligten Reaktionspartner vorliegen, und dies ist der Fall, je kleiner das luminaire Volumen des ER ist. Schließlich muß das sekretorische Protein das ER an hierfür spezialisierten Orten verlassen, indem es in Transportvesikel eingeschlossen wird, die vom ER abgeschnürt werden. Ein sekretorisches Protein kann wiederum um so schneller zu diesen "Ausgängen" des ER gelangen, je kleiner das luminaire Volumen ist. Insgesamt ist es also für die Aufgaben des ER bei der Sekretion von Proteinen optimal, ein möglichst großes Verhältnis von Oberfläche zu Volumen zu haben und in der gesamten Zelle verteilt zu sein.

Auch die Struktur des Golgi-Apparates kann durch seine Funktion bedingt sein. Eine Aufgabe des Golgi-Apparates ist es, die Oligosaccharid-Seitenketten von Proteinen durch schrittweises Abspalten und Anfügen von Monosacchariden zu modifizieren. Für diese Reaktionen ist es wichtig, daß sie in der richtigen Reihenfolge ablaufen. Eine Möglichkeit dies zu gewährleisten ist es, die Enzyme für die aufeinanderfolgenden Reaktionen in aufeinanderfolgenden Zisternen des Golgi-Apparates zu lokalisieren. Die Lokalisation des Golgi-Apparates in der Nähe des Centrosoms ist jedoch für eine effiziente Sekretion nicht erforderlich (Bloom und Goldstein, 1998).

1.2. Die Fusion von Membranvesikeln bei der Bildung des ER und des Golgi-Apparates

Ein wichtiger Schritt bei der Bildung der Membranstrukturen des ER und des Golgi-Apparates, z.B. am Ende der Mitose, ist die Fusion von Membranvesikeln des ER beziehungsweise des Golgi-Apparates miteinander. Diese sogenannten homotypischen Fusionsreaktionen, d.h. Fusionsreaktionen zwischen Membranen des gleichen Kompartiments, scheinen nach ähnlichen Mechanismen wie die gut untersuchten heterotypischen Fusionsreaktionen beim Vesikeltransport entlang des exo- und

endocytotischen Transportweges abzulaufen (Wilson, 1995). Die verschiedenen heterotypischen Fusionsreaktionen benutzen eine gleiche allgemeine Fusionsmaschinerie, die aus den Proteinen NSF ("NEM-sensitive factor") und SNAP ("soluble NSF attachment protein") besteht (Weidman et al., 1989; Robinson et al., 1997; Rothman und Wieland, 1996). NSF und SNAP sind cytosolische Proteine, die zum Teil membranassoziiert vorliegen. Die Funktion von NSF, und damit die Fusionsreaktion, kann durch N-Ethylmaleimid (NEM), ein Reagenz, das SH-Gruppen alkyliert, gehemmt werden. NSF und SNAP interagieren mit spezifischen Proteinen auf den beiden Membranen, die miteinander fusionieren sollen, den sogenannten SNAP-Rezeptoren, SNARE's (Söllner et al., 1993; Rothman, 1994). Da entlang des sekretorischen Transportweges immer Transportvesikel eines Ausgangskompartiments mit der Membran des Zielkompartiments fusionieren, gibt es die SNAREs der Transportvesikel, v-SNAREs (für Vesikel-SNAREs), und die SNAREs des Zielkompartiments, t-SNAREs (engl. für target-SNAREs). Die Proteine der SNARE-Familie sind Membranproteine mit einem Membrananker oder einem Lipidanker. Nach der "SNARE-Hypothese" wird angenommen, daß jedes Kompartiment der eukaryontischen Zelle, das an Fusionsreaktionen mit anderen Kompartimenten beteiligt ist, mindestens ein spezifisches SNARE besitzt (Rothman und Warren, 1994). Nur die richtigen Paare von v-SNARE und t-SNARE können aneinander binden, dadurch die allgemeine Fusionsmaschinerie rekrutieren und die Fusion auslösen. An der Regulation der Fusionsreaktion sind außerdem die sogenannten "rab"-Proteine, eine Familie von membranassoziierten Proteinen aus der Superfamilie der kleinen G-Proteine, beteiligt (Gorvel et al., 1991; Sogaard et al., 1994). Jedes rab-Protein ist an einer ganz bestimmten Fusionsreaktion in der Zelle beteiligt und scheint dort eine "Proofreading"-Funktion wahrzunehmen (Rybin et al., 1996; Novick und Zerial, 1997). Die Funktion der rab-Proteine, und somit die Fusionsreaktion, kann durch GTP γ S inhibiert werden.

Die homotypische Fusion von Vesikeln des Golgi-Apparates wurde mit Hilfe von *in vitro* Systemen untersucht, in denen der Golgi-Apparat von Zellkulturzellen zunächst in der Mitose oder durch Ilimaquinon, ein Stoffwechselprodukt des Schwammes *Hippospongia metachromia*, deassembliert wird (Takizawa et al., 1993; Rabouille et al., 1995a). An der

Reassemblierung sind sowohl NSF und SNAP als auch ein zu NSF entfernt homologes Protein, p97, beteiligt (Acharya et al., 1995a; Acharya et al., 1995b; Rabouille et al., 1995b). Ein p97-bindendes Protein, p47, ist ebenfalls für die Reassemblierung notwendig (Kondo et al., 1997). Mit Hilfe eines anderen *in vitro* Systems wurde gezeigt, daß für die homotypische ER-Fusion in *S.cerevisiae* das zu p97 homologe Hefeprotein CDC48p notwendig ist, nicht aber das direkt homologe Protein von NSF, Sec18p, sowie das zu SNAP homologe Protein, Sec17p (Latterich und Schekman, 1994; Latterich et al., 1995). Kürzlich wurde in beiden Systemen ein t-SNARE entdeckt, das an der homotypischen Fusion beteiligt ist (Patel et al., 1998; Rabouille et al., 1998). Indirekte Befunde lassen vermuten, daß auch ein rab-Protein an der Fusion von ER-Membranen beteiligt ist (Turner et al., 1997). Es ist nicht bekannt, ob irgendeines der erwähnten Proteine an den Fusionsreaktionen bei der Bildung der Zellkernhülle beteiligt ist. Dies ist jedoch naheliegend, da die äußere Kernmembran durch die Membran des ER gebildet ist und die Bildung der Kernhülle durch GTP γ S und NEM inhibiert werden kann und somit rab-Proteine und NSF- oder p97-ähnliche Proteine hieran beteiligt sein könnten (Marshall und Wilson, 1997).

1.3. Die Beteiligung von Cytoskelettstrukturen an der Lokalisation und Bildung des ER und des Golgi-Apparates in der Zelle

Mikrotubuli sind polarisierte Cytoskelett-Strukturen mit sogenannten Plus- und Minusenden. In den meisten eukaryontischen Zellen befinden sich die Minusenden eingebettet im Centrosom und die Mikrotubuli erstrecken sich mit ihren Plusenden in die Peripherie der Zelle. Das Centrosom befindet sich im Zentrum der Zelle in der Nähe des Zellkerns.

Werden Zellkulturzellen mit Nocodazol, einem Reagenz, das die Depolymerisation der Mikrotubuli bewirkt, behandelt, so bleibt das ER noch bis zu zwei Stunden intakt und kollabiert dann zum Zentrum der Zelle hin (Terasaki et al., 1986). Wird Nocodazol entfernt, bilden sich vom Centrosom aus Mikrotubuli, und in einem Zeitraum von etwa 15

Minuten auch wieder die Membrantubuli des ER (Lee et al., 1989). Die Dichte der neugebildeten Mikrotubuli in einem gegebenen Ausschnitt der Zelle korreliert dabei gut mit dem Ausmaß der ER-Neubildung. Die Membrantubuli des ER verlaufen zum Teil über viele Mikrometer mit den Mikrotubuli zusammen (Terasaki et al., 1986). Die Depolymerisation der Actin-Filamente durch Behandlung von Zellkulturzellen mit Cytochalasin B hat keinen Einfluß auf die Struktur des ER oder die Neubildung des ER nach Nocodazol-Behandlung (Lee et al., 1989).

Die Bildung und Bewegung von Membrantubuli des ER entlang von Mikrotubuli wurde in mehreren *in vitro* Systemen beobachtet. Hierbei gibt es unterschiedliche Ergebnisse hinsichtlich der Bewegungsrichtung entlang der Mikrotubuli und des Bewegungsmechanismus. Eine Art der Bewegung erfolgt durch Mikrotubuli-abhängige Motorproteine, die sich spezifisch in eine Richtung entlang der Mikrotubuli bewegen und an die Membran des ER binden können. Es gibt zwei Klassen Mikrotubuli-abhängiger Motorproteine: Die Proteine der Kinesin-Familie, von denen sich die meisten zum Plusende der Mikrotubuli bewegen und das cytoplasmatische Dynein, das sich zum Minusende bewegt. In den verschiedenen *in vitro* Systemen bewegten sich die Membrantubuli entweder ausschließlich zum Plusende der Mikrotubuli oder ausschließlich zum Minusende (Vale und Hotani, 1988; Allen und Vale, 1991). Die Bewegung zum Minusende wurde in einem *in vitro* System beobachtet, das einen Extrakt aus den Eiern von *X.laevis* verwendet. Hier verhindern Antikörper gegen eine Untereinheit von Dynein die Bildung und Bewegung der Membrantubuli entlang von Mikrotubuli, in Übereinstimmung mit der Annahme, daß Dynein an diesem Prozeß beteiligt ist (Steffen et al., 1997). Die Bedeutung der Bewegung von Membrantubuli des ER zum Minusende der Mikrotubuli in der Zelle ist nicht klar. Es könnte sein, daß es sich hierbei um einen Spezialfall in großen Eizellen oder frühen Stadien der Embryonalentwicklung handelt. Dagegen könnten zum Plusende der Mikrotubuli gerichtete Motorproteine aus der Kinesinfamilie, die an spezifische Rezeptoren der ER-Membran binden, die Lokalisation des ER in der Peripherie der Zelle bewirken (Hirokawa, 1998). An den Enden der im *Xenopus* System gebildeten Membrantubuli, die mit den Mikrotubuli in Kontakt stehen, sind in elektronenmikroskopischen Bildern große, globuläre Domänen zu sehen, die

vielleicht eine Anreicherung von Motorprotein-Komplexen darstellen (Allen und Vale, 1994). *In vitro* wurde außerdem beobachtet, wie Membrantubuli offensichtlich durch das Ziehen eines an die Membran gebundenen Motorproteins entlang von Mikrotubuli entstehen können (Debora und Sheetz, 1988; Hotani und Vale, 1988). Weiterhin wurde beobachtet, wie Membrantubuli miteinander fusionieren und dadurch polygonale Netzwerke bilden können. Diese Vorgänge bei der Bildung polygonaler Membrannetzwerke *in vitro* haben große Ähnlichkeit mit der Dynamik des ER in Zellen (Abb. 1D).

Ein Motorprotein-unabhängiger Mechanismus der Bildung und Bewegung von Membrantubuli wurde *in vitro* beobachtet, bei dem Membrantubuli mit den Plusenden der Mikrotubuli über sogenannte "tip-attachment complexes" verbunden sind und sich mit den verlängernden oder verkürzenden Mikrotubuli bewegen (Waterman-Storer et al., 1995).

Der Golgi-Apparat deassembliert nach der Zugabe von Nocodazol zunächst und mit der Zeit entstehen viele kleine Golgi-Stapel, die in der gesamten Zelle verteilt sind (Cole et al., 1996; Lippincott-Schwartz, 1998; Bloom und Goldstein, 1998). Nach Entfernen von Nocodazol und der Neubildung der Mikrotubuli bewegen sich die Golgi-Stapel wieder in die Nähe des Centrosoms und vereinigen sich dort. Für die Lokalisation des Golgi-Apparates in der Nähe des Centrosoms könnten zum Minusende der Mikrotubuli gerichtete Motorproteine, wie Dynein, verantwortlich sein. Die beste Evidenz für einen solchen Mechanismus kommt aus Untersuchungen von Zellen, in denen das Gen für eine Untereinheit des cytoplasmatischen Dyneins entfernt wurde. In diesen Zellen ist der Golgi-Apparat deassembliert und in der ganzen Zelle verteilt (Harada et al., 1998). Werden Zellkulturzellen mit Brefeldin A, einem Stoffwechselprodukt von *Penicillium brefeldianum*, behandelt, so bilden die Membranen des Golgi Apparates lange Membrantubuli zum ER aus, über die der Golgi-Apparat vollständig im ER verschwindet (Klausner et al., 1992; Sciaky et al., 1997). Die durch Brefeldin A induzierte Bildung der Golgi-Membrantubuli und das Verschwinden des Golgi-Apparates wird durch Antikörper gegen eine Untereinheit von Kinesin verhindert und ist somit abhängig von einem

Motorprotein und damit wahrscheinlich auch von Mikrotubuli (Lippincott-Schwartz et al., 1995).

Zusammengenommen zeigen diese Ergebnisse, daß Mikrotubuli an der Bildung und der Aufrechterhaltung des ER beteiligt sind. In allen bisher bekannten *in vitro* Systemen sind Mikrotubuli für die Bildung des ER notwendig. Die Aufrechterhaltung der Strukturen des ER in der Zelle kann jedoch nicht allein durch Mikrotubuli zustande kommen, da das Membrannetzwerk des ER nach der Depolymerisation der Mikrotubuli noch für längere Zeit erhalten bleibt. Zwei weitere Befunde deuten darauf hin, daß es Mikrotubuli-unabhängige Mechanismen zum Erhalt der Struktur des ER gibt: Zum einen gibt es Zelllinien, in denen wie bereits erwähnt das ER auch während der Mitose als Netzwerk vorliegt (Ellenberg et al., 1997; Yang et al., 1997), obwohl der Großteil aller Mikrotubuli die mitotische Spindel bildet. Zum anderen haben Reagenzien, die die Depolymerisation der Mikrotubuli bewirken, in *S.cerevisiae* keinen Einfluß auf die netzwerkartige Struktur des peripheren ER (W. Prinz und T.A. Rapoport, unveröffentlichte Ergebnisse). Da es Mikrotubuli-unabhängige Mechanismen für die Aufrechterhaltung des ER gibt, ist es denkbar, daß auch für die Bildung Mikrotubuli-unabhängige Mechanismen existieren, die in den bisherigen *in vitro* Systemen noch nicht nachgewiesen wurden.

1.4. Die Bildung von Zellkernen im *Xenopus in vitro* System

Die Kernhülle ist ein Beispiel für eine abgeflachte Membranstruktur der Zelle. Sie hat Ähnlichkeit mit den abgeflachten Membranzisternen des ER und Golgi-Apparates. Bisher sind keine Faktoren bekannt, die direkt an der Bildung der Membranhülle des Zellkerns beteiligt sind, obwohl die Bildung von Zellkernen in einer Reihe verschiedener *in vitro* Systeme charakterisiert wurde. Am häufigsten wurden die Extrakte der Eier des Krallenfrosches *Xenopus laevis* verwendet. Im folgenden werden die einzelnen Phasen der Zellkernbildung in diesem System genauer beschrieben.

Bei der Befruchtung der Eizelle von *X.laevis* gelangt der Zellkern eines Spermiums in die Eizelle. Die Kernhülle des Spermiums wird sehr schnell deassembliert, und die hochkompakte DNA wird dekontensiert. Nach kurzer Zeit formt sich wieder eine Kernhülle um das dekontensierte Spermien-Chromatin, wie auch um das Chromatin der Eizelle, die vor der Befruchtung in der Metaphase der MeioseII arretiert war. Der Spermienpronukleus wandert zum Zentrum der Eizelle und assoziiert dort mit dem Pronukleus der Eizelle. Das Vermischen von Ei- und Spermien-Chromatin geschieht vor oder während der ersten Zellteilung (Longo und Kunkle, 1978).

Wird zu dem Chromatin von *X.laevis* Spermien ein Extrakt aus den Eiern gegeben, so bilden sich um dieses Chromatin "Zellkerne". Diese Kernbildung *in vitro* entspricht wahrscheinlich der Bildung des Pronukleus um das Spermium-Chromatin bei der Befruchtung der Eizelle. Die *in vitro* assemblierten Zellkerne besitzen eine Kernhülle aus einer inneren und einer äußeren Kernmembran, Kernporen und eine Kernlamina und zeigen viele der Eigenschaften "wahrer" Zellkerne, wie Kernimport durch die Kernporen, semi-konservative, einmalige Replikation der DNA und Deassemblierung unter mitotischen Bedingungen (Lohka und Masui, 1984; Blow und Laskey, 1986; Newport und Forbes, 1987). Der Eiextrakt kann in ein oder mehrere Membranfraktionen und Cytosol aufgetrennt werden (Vigers und Lohka, 1991; Wilson und Newport, 1988). Der Prozeß der Kernbildung kann in diesem *in vitro* System in mehrere Schritte unterteilt werden: Als erstes dekontensiert das Spermien-Chromatin, danach können Membranvesikel an das Chromatin binden, die miteinander fusionieren und schließlich eine geschlossene Kernhülle bilden. Die resultierenden kleinen Zellkerne vergrößern ihren Durchmesser im weiteren Verlauf der Reaktion um ein mehrfaches.

1.4.1. Die Dekondensation des Chromatins

Zu Beginn der Reaktion hat das Spermien-Chromatin eine S-förmige Gestalt mit einer Länge von etwa 10µm und einem Durchmesser von 1µm. In dieser Struktur ist der haploide Chromosomensatz des Spermiums dicht zusammengepackt. Wird Spermien-

Chromatin zu einem Eiextrakt oder der cytosolischen Fraktion des Eiextraktes gegeben wird, dekondensiert das Chromatin in 5-10 Minuten. Die Dekondensation lässt sich als einfache Vergrößerung des Spermium-Chromatins auf eine Länge von etwa 30µm und einen Durchmesser von etwa 3µm beschreiben. Auf molekularer Ebene ist die Dekondensation nur zum Teil verstanden. Die dichte Packung der DNA im Spermium wird durch basische Proteine gewährleistet. Die basischen Proteine im Spermien-Chromatin der Säuger sind die Protamine. In *X.laevis* sind es die Proteine X und Y, die entfernte Homologie zu den Histonen haben (Philpott und Leno, 1992). Während der Dekondensation werden die Proteine X/Y abgelöst und die Histone H2A und H2B an die bereits im Spermium-Chromatin vorliegenden Histone H3 und H4 gebunden. Dabei bilden sich Nukleosomen, in denen die DNA um Histonoktamere gewunden ist (Kleinschmidt et al., 1990). Benachbarte Nukleosomen eines DNA-Stranges sind durch das Histon H1 verbunden und die so gepackte DNA erscheint im elektronen-mikroskopischen Bild (EM-Bild) als eine sogenannte 30nm-Chromatin-Faser. Diese 30nm-Chromatin-Faser ist wahrscheinlich noch weiter verpackt, z.B. durch die Bildung von Schleifen um ein zentrales Gerüst. Es ist nicht bekannt, ob solche Strukturen höherer Ordnung im *Xenopus in vitro* System gebildet werden. Jedoch findet man in *X.laevis* ein zum Histon H1 ähnliches Histon am dekondensierten Spermiumchromatin, das Histon B4 genannt wird (Dimitrov et al., 1994). Außerdem assemblieren einige HMG (high mobility group) Proteine an das Chromatin. HMG Proteine sind kleine, in ihrer Sequenz nahe verwandte Chromatinproteine, von denen z.B. HMG14 und 17 die Nukleosomen von transkriptionell aktivem Chromatin binden (Trieschmann et al., 1991).

Für die Dekondensation des Spermium-Chromatins im *Xenopus* Eiextrakt ist das Protein Nucleoplasmin essentiell (Philpott et al., 1991). Wird Nucleoplasmin aus dem Extrakt immunodepletiert so findet keine Vergrößerung des Spermium-Chromatins statt und die Proteine X/Y werden nicht abgelöst. Gereinigtes Nucleoplasmin zusammen mit Histonen bewirkt die Vergrößerung des Spermium-Chromatins, die Dissoziation von X/Y und die Assemblierung von Nukleosomen (Philpott und Leno, 1992).

Die Vergrößerung des Spermien-Chromatins kann auch einfach durch die Zugabe von Polyglutamat mit einem Molekulargewicht von 30-80 kDa erreicht werden (Pfaller et al.,

1991). Polyglutamat bindet wahrscheinlich die basischen Proteine X und Y und löst sie so vom Chromatin ab. Dies wiederum scheint ausreichend zu sein, um die kompakte Packung des Spermium-Chromatins zu zerstören. Interessanterweise besitzt Nucleoplasmin einen 12 Aminosäuren langen Abschnitt aus Glutamat-Resten (Dingwall et al., 1987). Da Kernmembranvesikel gleich gut an durch Eiextrakt dekontensiertes Chromatin wie an nur durch Polyglutamat vergrößertes Chromatin binden, scheinen Chromatin-Proteine aus dem Eiextrakt in diesem System für die Bindungsreaktion nicht notwendig zu sein.

1.4.2. Die Bindung von Membranvesikeln an das dekontensierte Chromatin

Nach der Dekontensation des Spermien-Chromatins können Membranvesikel binden. Die gebundenen Membranvesikel haben einen Durchmesser von etwa 70nm (Newport und Dunphy, 1992). An der Bindung von Kernmembranvesikeln an das dekontensierte Spermien-Chromatin im *Xenopus*-System sind sowohl Proteine der Membranvesikel als auch des Chromatins beteiligt, da die Behandlung jeder einzelnen Komponente mit der Protease Trypsin die Bindung verhindert (Wilson und Newport, 1988; Newport und Dunphy, 1992). Die Bindung benötigt kein Cytosol und keine Energie in Form von ATP. Die unter diesen Bedingungen an das Chromatin gebundenen Membranvesikel stellen ein funktionelles Intermediat der Kernassemblierung dar, da die nachträgliche Zugabe von Cytosol, ATP und GTP die Fusion der gebundenen Kernvesikel und die Bildung einer Kernhülle bewirkt (Newport und Dunphy, 1992). Membranvesikel, die aus einem Eiextrakt hergestellt wurden, der sich in einem mitotischen Zustand befindet, binden das dekontensierte Spermien-Chromatin nicht. Dies zeigt, daß mindestens eine an der Bindung der Membranvesikel beteiligte Membrankomponente im Zellzyklus reguliert ist (Vigers und Lohka, 1992). Chromatin-gebundene Membranvesikel werden durch mitotisches Cytosol vom Chromatin abgelöst (Pfaller et al., 1991; Pfaller und Newport, 1995). Ein Experiment deutet darauf hin, daß die Chromatin-bindenden Membranvesikel Mischvesikel sind, d.h. aus Proteinen und Lipiden sowohl der inneren als auch der äußeren Kernmembran bestehen (Wilson und Newport, 1988). Es wurden Membranvesikel mit einem Überschuß an Spermien-Chromatin inkubiert, um alle Chromatin-bindenden

Membranvesikel an das Chromatin zu binden. Daraufhin wurde das Chromatin mit den gebundenen Membranvesikeln von den ungebundenen abgetrennt und bestimmt, wie sich ein ER-Markerprotein auf die gebundene und der ungebundene Fraktion verteilt. Es stellte sich heraus, daß unter diesen Bedingungen 20% eines ER-Markerproteins in der Chromatin-bindenden Fraktion zu finden sind. Dies ist in Übereinstimmung mit der Existenz von mindestens zwei ER-Vesikelpopulationen, von denen die eine Proteine der inneren Kernmembran enthält, die es dieser Vesikelpopulation ermöglichen, ans Chromatin zu binden.

Mehrere integrale Membranproteine der inneren Kernmembran wurden identifiziert, die *in vitro* an Chromatin binden, und somit geeignet wären, die Bindung von Kernmembranvesikeln ans Chromatin zu bewirken. Eines dieser Proteine ist der Lamin B Rezeptor (LBR). Er gehört zu den mengenmäßig häufigsten Proteinen der inneren Kernmembran, und bindet *in vitro* Lamin B, DNA und Chromatin (Worman et al., 1988; Smith und Blobel, 1994; Ye und Worman, 1994). In einem *in vitro* System wurde gezeigt, daß der LBR für den Großteil der beobachteten Bindung von Kernmembranvesikeln an Chromatin verantwortlich ist (Pyrcasopoulou, 1996). Hierzu wurden die Zellkernhüllen von Rattenleberzellen oder Truthahn-Erythrozyten mit Detergens solubilisiert und nach dem Entfernen des Detergens durch Dialyse rekonstituierte Membranvesikel erhalten, die an Chromosomen aus Metaphasen-CHO- (Chinese hamster ovary) Zellen binden konnten. Wenn nach dem Solubilisieren der Membranvesikel der LBR immunodepletiert wurde, verringerte sich die Bindungsaktivität. Durch die Zugabe von gereinigtem LBR wurde die Bindungsaktivität wieder erhalten. In einem anderen *in vitro* System, das einen Extrakt aus Seeigel-Eiern und Seeigel-Spermien verwendet, wurden die Chromatin-bindenden Membranvesikel mit Antikörpern, die gegen das zum LBR aus *H.sapiens* homologe Seeigel-Protein gerichtet sind, vorinkubiert. Dies führte ebenfalls dazu, daß diese Membranvesikel nicht mehr binden konnten (Cameron und Poccia, 1994; Collas et al., 1996).

Interessanterweise wird der LBR sowohl durch die mitotische CDC2-Kinase als auch durch eine weitere Kinase phosphoryliert, die mit dem LBR in einem Komplex vorliegt

(Courvalin et al., 1992; Simos und Georgatos, 1992). Eine Zellzyklus-abhängige Phosphorylierung des LBR könnte mit den im *Xenopus*-System beobachteten Bindungseigenschaften der Membranvesikel im Zellzyklus korrelieren (Appelbaum et al., 1990). Darüberhinaus wurde eine Interaktion der nukleoplasmatischen, N-terminalen Domäne des LBR mit einem Protein des Heterochromatins, HP-1, in einem Hefe-”Two-Hybrid-Screen” entdeckt (Ye und Worman, 1996). Diese Befunde lassen den LBR sehr geeignet erscheinen, für die im Zellzyklus regulierte Bindung von Membranvesikeln und der Kernhülle ans Chromatin verantwortlich zu sein. Überraschenderweise ist die Bindung des LBR an Lamin oder die Kernlamina nicht für die Bindung der Membranvesikel an das Chromatin notwendig, da Lamine während der Bindungsreaktion entweder nicht vorhanden waren (Pyrrasopoulou et al., 1996) oder erst zu einem späteren Stadium der Kernassemblierung in den sich bildenden Zellkern eingebaut wurden (Collas et al., 1996). Möglicherweise ist also die Bindung des LBR an das Chromatin die entscheidende Interaktion für die Bildung der Kernhülle.

Es ist auffällig, daß alle bisher identifizierten Proteine der inneren Kernmembran zumindest *in vitro* Lamin binden können. Die Bindung von Proteinen an die Kernlamina könnte die Proteine der inneren Kernmembran stabil verankern, und somit der Sortierung dieser Proteine dienen. Hiermit ist in Übereinstimmung, daß der LBR in der Interphase keine meßbare Diffusion in der inneren Kernmembran zeigt, im Gegensatz zu Membranproteinen des ER, weil er wahrscheinlich fest gebunden an die Kernlamina vorliegt (Ellenberg et al., 1997).

1.4.3. Die Fusion der Chromatin-gebundenen Membranvesikel

Nach der Bindung an das Chromatin fusionieren die Membranvesikel miteinander und bilden mit der Zeit eine kontinuierliche Hülle um das Chromatin. Die Fusionsreaktion benötigt ATP und GTP und kann durch GTP γ S inhibiert werden (Boman et al., 1992). Die Behandlung der Membranvesikel mit NEM inhibiert ebenfalls die Fusion, aber nicht die Bindung an Chromatin (Vigers und Lohka, 1991; Newport und Dunphy, 1992). Es ist

daher gut möglich, daß an der Fusion der Chromatin-gebundenen Membranvesikel bereits bekannte Proteine, wie das NEM-sensitive NSF oder p97, sowie kleine G-Proteine aus der Familie der rab-Proteine beteiligt sind.

Eine partielle Fusion zwischen den Chromatin-gebundenen Membranvesikeln findet bereits ohne Cytosol statt. Das bedeutet, daß wenigstens ein Teil aller für die Fusion notwendigen Proteine membranassoziiert ist. Die partielle Fusion in Abwesenheit von Cytosol führt jedoch nicht zur Bildung einer kontinuierlichen Kernhülle (Wiese und Wilson, 1993). Eine mögliche Erklärung hierfür ist, daß das Cytosol die Fusionsreaktionen der Chromatin-gebundenen Membranvesikel stimuliert oder daß zusätzlich zur Cytosol-unabhängigen Fusion eine Cytosol-abhängige Fusionsreaktion für die Bildung einer kontinuierlichen Kernhülle notwendig ist. Eine andere Möglichkeit ist, daß eine nicht an der Fusion beteiligte Aktivität aus dem Cytosol gebraucht wird.

Wird die Kernbildung im Eiextrakt durchgeführt, so verändert sich mit der Fusion und der Bildung einer kontinuierlichen Kernhülle die ursprünglich zylindrische Form des Chromatins zu einer runden Form. In dieser Phase werden auch die Kernporen in der Kernhülle assembliert (Powers et al., 1995). Einige Untereinheiten der Kernporen sind integrale Membranproteine, während andere vor der Assemblierung als lösliche Proteine in dem Cytosol vorliegen. Die Kerne sind zunächst noch klein und vergrößern ihren Durchmesser in der nächsten Phase bis zu fünffach. Für diese Größenzunahme ist Kernimport essentiell, da Inhibitoren des Kernimports wie "Wheat germ agglutinin" oder dominant negativ wirkende Varianten von Kernimportfaktoren die Größenzunahme verhindern (Kornbluth et al., 1994; Dasso et al., 1994). Wie können die kleinen Zellkerne, die bereits eine kontinuierliche Kernhülle besitzen, größer werden? Eine Möglichkeit ist, daß Membranvesikel mit der äußeren Kernmembran fusionieren. Die innere Kernmembran müßte dann Lipide und Membranproteine über die Verbindungsstelle an den Kernporen von der äußeren Kernmembran zugeführt bekommen (Gerace und Burke, 1988). Es ist denkbar, daß verschiedene Vesikelpopulationen an der frühen und der späten Fusion beteiligt sind, z.B. Vesikel mit Proteinen der inneren Kernmembran zum einen, und reine ER-Membranvesikel zum anderen.

1.4.4. Die Kernlamina

Der Kernhülle ist eine Kernlamina unterlegt. Die Kernlamina ist ein 2-dimensionales Netzwerk vom Typ der Intermediärfilamente und besteht aus den verschiedenen Laminen einer Zelle (Aebi et al., 1986). Die Rolle der Lamine bei der Bildung der Kernmembran ist nicht eindeutig geklärt, da die verschiedenen *in vitro* Systeme unterschiedliche Ergebnisse zeigen (siehe weiter unten). Eine generelle Aufgabe der Intermediärfilamente ist es, Zellstrukturen Stabilität gegen mechanische Beanspruchung zu verleihen. Beispiele hierfür sind die Neurofilamente in den Axonen von Nervenzellen und Keratinfilamente in den Zellen der Haut. Die Lamine unterscheiden sich von den anderen Intermediärfilament-Proteinen durch das Vorhandensein einer Kernlokalisationssequenz. Durch ihre C-terminale Isoprenylierung sind die Lamine, und damit auch die von ihnen gebildete Kernlamina, mit der inneren Kernmembran assoziiert (Kitten und Nigg, 1991). Die Kernlamina unterscheidet sich auch durch ihre Fähigkeit zur schnellen und vollständigen Deassemblierung in der Mitose von allen anderen Intermediärfilamenten (Nigg, 1992). Drei verschiedene Lamine werden in Säugern unterschieden: Typ A, B und C. Die Lamine A und C sind Splice-Varianten desselben Gens (Krohne und Benavente, 1986). Bei ihnen wird der isoprenylierte C-Terminus nach der Assemblierung in die Kernlamina abgeschnitten. Daher werden die Lamine A und C bei der Deassemblierung der Kernlamina in der Mitose löslich, während Lamin B membrangebunden bleibt. Lamin B könnte somit bei der Reassemblierung des Zellkerns den Ausgangspunkt für die Bildung der Kernlamina darstellen. Lamin B ist das einzige Lamin, das in allen Zellen, die eine Kernlamina besitzen, vorkommt. Lamin A bindet spezifisch Chromatin und könnte somit den Kontakt zwischen der Kernlamina und dem Chromatin herstellen (Schmidt und Krohne, 1995; Pugh et al., 1997).

In der *Xenopus*-Eizelle sind drei Lamine bekannt, die sämtlich vom B-Typ sind, Lamin I, II und III (Lourim et al., 1996). Lamin III ist das häufigste der drei Lamine (molare Verhältnisse I:II:III=10:1:100). Es ist im Gegensatz zu Lamin B in Säugern nicht

membranassoziiert. Von Lamin I und II sind 5-15% mit Membranen assoziiert (Lourim und Krohne, 1993). Alle drei Lamine werden im *Xenopus in vitro* System in die Kernlamina assembliert, scheinen jedoch nicht für die Bindung von Kernmembranvesikeln an das Chromatin, für die Fusion und die Bildung einer geschlossenen Kernhülle notwendig zu sein. Wird Lamin III aus dem Eiextrakt immunodepletiert, werden Zellkerne gebildet, die allerdings nur halb so groß wie sonst und sehr fragil sind. Sie besitzen keine detektierbare Kernlamina und sind nicht zur DNA-Replikation in der Lage (Newport et al., 1990; Meier et al., 1991). Darüberhinaus wurde beobachtet, daß eine kleine Zahl der Kernporen falsch orientiert in der Kernhülle eingebaut war (Goldberg et al., 1995). Da Lamin I und II in diesen Experimenten nicht depletiert wurden, kann nicht ausgeschlossen werden, daß in diesem System Lamine an der beobachteten Kernassemblierung beteiligt sind. Die Zugabe von Lamin I, dem die N-terminale Domäne fehlt, verhindert die Bildung einer Kernlamina in einer Kernassemblierungsreaktion und hat die gleichen Effekte wie die Immunodepletion von Lamin III (Ellis et al., 1997). Im Seeigel *in vitro* System wurde durch die Immunodepletion der in diesem System bekannten Lamine gezeigt, daß die Lamine für die Bildung der Kernhülle nicht notwendig sind, wohl aber für die Größenzunahme des Zellkerns (Collas, 1995).

Dies ist anders in Experimenten, in denen ein Extrakt aus *Drosophila melanogaster*-Embryos mit *Xenopus* Spermien-Chromatin beziehungsweise ein Homogenat aus CHO-Zellen in der Metaphase der Mitose benutzt wurde (Ulitzur et al., 1992; Ulitzur et al., 1997; Burke und Gerace, 1986). Hier verhindern Antikörper gegen das *D.melanogaster* Lamin beziehungsweise gegen Lamin A/C oder Lamin B die Bindung von Kernmembranvesikeln an das Chromatin. Es ist demnach denkbar, daß es zwei verschiedene Arten der Bindung von Kernmembranvesikeln an das Chromatin gibt, die eine abhängig, die andere unabhängig von Laminen. Bei der Lamin-abhängigen Bindung im Säugersystem könnte das Chromatin-bindende Lamin A mit dem Membran-gebundenen Lamin B zusammenwirken, während bei der Lamin-unabhängigen Bindung der LBR und Chromatinproteine wie das HP-1 eine Rolle spielen könnten.

1.4.5. Die Deassemblierung des Zellkerns

Die Deassemblierung des Zellkerns in der Mitose ist, wie auch die Assemblierung, ein vielschrittiger Prozeß. Ein Auslöser der Mitose ist die Aktivierung der CDC2-Kinase durch ihre Bindung an Cyclin B. Cyclin B akkumuliert in der vorhergehenden Interphase. Wird eine bestimmte Konzentration an Cyclin B in der Zelle überschritten, so resultiert durch positive Rückkopplungsmechanismen die plötzliche Aktivierung der CDC2/CyclinB-Kinase. Am Ausgang der Mitose wird Cyclin B ubiquitiniert und vom Proteasom abgebaut, so daß die CDC2/CyclinB-Kinaseaktivität verschwindet (Nishimoto et al., 1992). Die CDC2/CyclinB-Kinase steht an der Spitze einer Kaskade von Aktivierungs- und Deaktivierungsreaktionen, die schließlich die zahlreichen Schritte der Mitose bewirken. Häufig erfolgt die Regulation der Aktivität der beteiligten Proteine durch ihre Phosphorylierung oder Dephosphorylierung. Die Lamine gehören zu den in der Mitose regulierten Proteinen, die an der Deassemblierung des Zellkerns beteiligt sind. Ihre Phosphorylierung zu Beginn der Mitose löst die Deassemblierung der Kernlamina aus (Luscher et al., 1991; Dessev et al., 1991). Weiterhin werden einige Kernporenproteine spezifisch in der Mitose phosphoryliert (Macaulay et al., 1995). Die Bindung von Kernmembranvesikeln an das Chromatin wird wahrscheinlich durch die bereits erwähnte Phosphorylierung und Dephosphorylierung eines Chromatin-bindenden Membranproteins reguliert (Pfaller et al., 1991). Möglicherweise ist eine MAP-Kinase (Mitogen-aktivierte Proteinkinase) an der Regulation der Assemblierung/Deassemblierung des Zellkerns im Zellzyklus beteiligt. Die Expression einer konstitutiv aktiven Form der MAP-Kinase-Kinase (MEK), deren Substrat die MAP-Kinasen p42/p44 sind, verhindert die Bildung eines Pronukleus in befruchteten Mäuse-Eizellen (Moos et al., 1996).

Die im *Xenopus*-System gebildeten Zellkerne können durch die Zugabe eines mitotischen Extraktes deassembliert werden (Lohka und Maller, 1985; Newport und Spann, 1987). Um einen mitotischen Extrakt zu erhalten, macht man sich zunutze, daß das Ei in der Metaphase der MeioseII arretiert ist. Dieser Zustand ist einem mitotischen Zustand sehr ähnlich und läßt sich bei der Herstellung des Eiextraktes konservieren (Murray, 1991). Alternativ kann ein Eiextrakt, der in der Interphase vorliegt, durch die Zugabe einer Cyclin

B-Variante, die nicht ubiquitiniert wird und daher nicht durch das Proteasom abgebaut werden kann, stabil in einen mitotischen Zustand überführt werden (Murray et al., 1989; Holloway et al., 1993). Wird ein solcher "mitotischer" Extrakt zu isolierten Rattenleberzellkernen oder zu im *Xenopus* Eiextrakt hergestellten Zellkernen gegeben, so deassemblieren diese Zellkerne ganz ähnlich wie es bei Zellkernen intakter Zellen beobachtet wird. Die Kernmembran und die Kernlamina deassemblieren und das Chromatin wird zu Chromosomen verpackt. Im *Xenopus* System wurde festgestellt, daß die Deassemblierung der Kernlamina unabhängig von der Deassemblierung der Kernmembran und der Bildung der Chromosomen ablaufen kann und die Deassemblierung der Kernmembran unabhängig von der Chromosomenbildung ist (Newport und Spann, 1987). In diesem System geht die Deassemblierung der Kernlamina der Deassemblierung der Kernhülle voraus, es ist jedoch nicht bekannt, ob dies eine Voraussetzung für die Deassemblierung der Kernhülle ist (Miake-Lye und Kirschner, 1985).

1.5. Projektbeschreibung

Das ER und der Zellkern sind Beispiele für charakteristische Membranstrukturen der eukaryontischen Zelle. In dieser Arbeit sollten Mechanismen der Bildung der Zellkernhülle und des ER untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden *in vitro* Systeme etabliert, die einen Extrakt aus den Eiern von *Xenopus laevis* verwenden, der hierfür ausgezeichnet geeignet scheint. Dieser Extrakt muß besonders reich an Komponenten für die Bildung zellulärer Kompartimente, wie z.B. des Zellkerns, des ER oder der Plasmamembran sein, da nach der Befruchtung der Eizelle durch ein Spermium zwölf nahezu synchrone Zellteilungen ablaufen, durch die ein paar tausend neue Zellen in kürzest möglicher Zeit (etwa 30min pro Zellteilung) und ohne die Synthese von Membranen oder strukturellen Proteinen entstehen.

Um die Bildung der Zellkernhülle zu untersuchen wurde ein vereinfachtes *in vitro* System etabliert. Die in diesem System gebildeten Zellkerne bleiben klein und werden nicht kugelförmig, bilden aber eine geschlossene Kernhülle mit innerer und äußerer

Kernmembran. Die Phasen bei der Bildung der Kernhülle wurden mit Hilfe einer hochauflösenden Kamera verfolgt. Die miteinander fusionierenden Membranvesikel bilden zunächst kleine Flächen auf der Oberfläche des Chromatins, die größer werden und schließlich eine kontinuierliche, abgeflachte Kernhülle formen. In Abwesenheit von Cytosol können die Chromatin-gebundenen Membranvesikel miteinander fusionieren, flachen jedoch nicht auf der Oberfläche des Chromatins ab und bilden keine Kernhülle, sondern große, kugelförmige Membranvesikel. Eine oder mehrere cytosolische Aktivitäten sind demnach bei der Bildung der Zellkernhülle für das Abflachen der fusionierenden Membranvesikel auf der Oberfläche des Chromatins notwendig. Für die Identifizierung dieser Aktivitäten durch die Fraktionierung des Cytosols schafft das vereinfachte *in vitro* System die Voraussetzung.

Mit Hilfe des in dieser Arbeit entwickelten *in vitro* Systems zur Bildung der polygonen Membrannetzwerke des ER konnten zwei Schritte bei diesem Prozeß unterschieden werden. Die Fusion kleiner Membranvesikel miteinander braucht Energie in Form von ATP und GTP, ist sensitiv gegenüber dem Alkylierungsreagenz NEM und benötigt kein Cytosol. Sie ähnelt damit anderen homotypischen Fusionsreaktionen der Zelle. In Gegenwart von Cytosol führt die Fusion zur Bildung dünner Membrantubuli und der polygonen Membrannetzwerke. Ohne Cytosol entstehen durch die Fusion lediglich große, kugelförmige Membranvesikel. Eine cytosolische Aktivität ist demnach für die Bildung der Membrantubuli und der Netzwerke des ER notwendig.

Im Gegensatz zu allen bisher beschriebenen *in vitro* Systemen sind für die ER-Bildung in diesem *in vitro* System Mikrotubuli nicht notwendig. Es muß daher Mikrotubuli-unabhängige Mechanismen für die Bildung der tubulären Membranstrukturen des ER geben. Erste Fraktionierungen des Cytosols durch Gelfiltration und Anionenaustauscher-Chromatographie deuten darauf hin, daß es mit Hilfe dieses *in vitro* Systems möglich ist, die für die Mikrotubuli-unabhängige ER-Bildung notwendigen cytosolischen Faktoren zu identifizieren.

Die ER-Bildung *in vitro* wird durch Ca^{2+} gehemmt und findet unter verschiedenen mitotischen Bedingungen zu einem unterschiedlichen Ausmaß statt. Diese Eigenschaften der ER-Bildung *in vitro* könnten mit den ähnlichen Eigenschaften des ER in Zellen in Zusammenhang stehen.

2. MATERIAL UND METHODEN

Die verwendeten Laborchemikalien wurden, wenn nicht besonders im Text erwähnt, von Sigma (St.Louis, Missouri) in der reinsten verfügbaren Form bezogen. Rauhe Mikrosomen wurden wie beschrieben hergestellt (Walter und Blobel, 1983).

2.1. Herstellung des Eiextraktes

Der Eiextrakt wurde weitgehend wie beschrieben hergestellt (Newmeyer und Wilson, 1991; Murray, 1991). Zehn *X.laevis* werden je 50 Einheiten "pregnent mare serum gonadotropin" subkutan injiziert. 3 bis 10 Tage später werden 70 Einheiten "human chorionic gonadotropin" (Sigma) subkutan injiziert und die Frösche in 6l-Tanks mit 2l MMR-Puffer (5 mM Hepes/NaOH pH 7.7, 100 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 0.1 mM EDTA) gesetzt. 20-24 Stunden später werden die Eier entnommen, schlechte Eier aussortiert, die guten vereinigt und zweimal mit je 1l 2% Cystein, pH 7.7, über einen Zeitraum von 5 bis 10 Minuten die gelartige Hülle der Eier entfernt. Die Eier werden mehrfach mit insgesamt 4l 0.2 M NaCl gewaschen und danach mehrfach mit insgesamt 2l eiskaltem MWB (Membranen-Wasch-Puffer: 50 mM Hepes pH 7.7, 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 250 mM Saccharose, 2 mM DTT oder 7 mM β -Mercaptoethanol). Ab hier werden alle Schritte auf Eis durchgeführt. Die Eier werden mit einer Pasteurpipette mit weiter Öffnung in 3 bis 4 SW28 Zentrifugen-Gefäße (Beckman, Fullerton, California) überführt, in denen 5ml MWB mit Cytochalasin B (10 μ g/ml), Cycloheximid (50 μ g/ml) und Proteaseinhibitoren (PI: Leupeptin 10 μ g/ml, Chymostatin 5 μ g/ml, Elastatinal 2.5 μ g/ml, PepstatinA 1 μ g/ml, Aprotinin (10 μ g/ml)) vorgelegt sind. Überschüssiger Puffer wird abgenommen und die Eier durch Zentrifugation für 10 Minuten bei 10000 rpm, 4°C in einem HB4-Rotor (Sorvall, DuPont Company, Wilmington, Delaware) aufgeschlossen. Der Eiextrakt wird durch seitliches Anstechen der Zentrifugengefäße mit einer Spritze zwischen einer gelben Dotterschicht am oberen Ende und dem Pigmentpellet am unteren Ende entfernt (insgesamt etwa 30-50ml). Dieser Eiextrakt ist strohfarben und wird mit 2 mM DTT oder 7 mM β -Mercaptoethanol,

Cytochalasin B (10µg/ml), Cycloheximid (50µg/ml) und Proteaseinhibitoren (PI, siehe oben) versetzt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert wird oder weiter in Membranen und Cytosol fraktioniert.

2.2. Herstellung von Membranfraktionen und Cytosol aus dem Eiextrakt

Der Extrakt wird in SW40-Zentrifugengefäße (Beckman) überführt und in einem SW40 Rotor für 1h bei 40000rpm, 2°C zentrifugiert. Dabei pelletiert eine schwere Membranfraktion und im Überstand befindet sich das Cytosol und eine leichte Membranfraktion. Der Überstand wird mit einer Pipette abgenommen und im 100.4 Rotor (Beckman) für 1.5 hrs bei 100000 rpm, 2°C zentrifugiert. Danach befindet sich im Überstand weitgehend membranfreies Cytosol (15-25ml), das in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C für mehrere Monate gelagert werden kann. Das Pellet besteht aus einem lockeren Membranpellet (leichte Membranfraktion) und einem festen, gelblich, klaren Ribosomenpellet. Das Membranpellet wird mit einer Pipette abgenommen, in 10 Volumen MWB mit PI resuspendiert und im 100.4 Rotor für 10 Minuten bei 75000 rpm, 2°C zentrifugiert. Das nun feste Membranpellet wird nochmals in der gleichen Menge MWB mit PI wie vorher resuspendiert und zentrifugiert. Dieses Pellet wird in dem ursprünglichen Volumen der leichten Membranfraktion (etwa 3-5ml) in MWB mit PI resuspendiert und in kleinen Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das Pellet der schweren Membranfraktion wird in 20 Volumen MWB mit PI resuspendiert, auf ein 7 ml Kissen aus MWB plus 250 mM Saccharose in einem SW28-Zentrifugengefäß gegeben und in einem SW28 Rotor (Beckman) für 15 Minuten bei 20000 rpm, 2°C zentrifugiert. Das Pellet wird in einem Volumen (etwa 0.5ml) MWB mit PI resuspendiert und in kleinen Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren.

2.3. Herstellung von meiotischen Membranen und Cytosol

Die Eier werden bis einschließlich dem Waschen mit 0.2M NaCl so behandelt wie in 2.1. beschrieben. Danach werden sie in 2l EB-Puffer (80 mM β -Glycerophosphat pH 7.4, 20 mM EGTA, 15 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT) gewaschen und mit einem Volumen EB-Puffer mit 0.5 mM ATP γ S und PI in einem Dounce-Homogenisator aufgeschlossen (Pfaller und Newport, 1995). β -Glycerophosphat ist ein allgemeiner Phosphatase-Inhibitor und mit ATP γ S können Proteine stabil phosphoryliert werden. Beides dient dazu, den meiotischen Zustand des Extraktes zu erhalten. Die homogenisierten Eier werden für 10 Minuten bei 10000rpm, 2°C in einem SS34 Rotor (Sorvall) zentrifugiert. Der Überstand ist der meiotische Eiextrakt und kann in flüssigem Stickstoff weggefroren werden. Um eine Membranfraktion und Cytosol zu erhalten, wird der Extrakt für zwei Stunden, 40000rpm, 2°C im SW40 Rotor zentrifugiert. Im Überstand befindet sich nun das meiotische Cytosol, das wie üblich eingefroren werden kann. Die obere Schicht des Pellets enthält die Membranen, die wahrscheinlich der leichten Membranfraktion von 2.2. entsprechen. Sie kann vorsichtig mit einer Pipette, deren Spitze eine große Öffnung besitzt, abgenommen werden und in 10 Volumen EB-Puffer mit PI resuspendiert werden. Nach Zentrifugation für 30 Minuten bei 50000 rpm, 2°C im Ti50.2 Rotor wird das Membranpellet in einem kleinen Volumen EB-Puffer mit PI resuspendiert und in kleinen Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren.

2.4. Herstellung von mitotischem Extrakt sowie mitotischen Membranen und Cytosol

Zur Herstellung des mitotischen Extraktes wird zu Interphasen Extrakt 0.1mg/ml Cyclin B gegeben und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das Cyclin B besitzt eine C-terminale Deletion und wird deshalb nicht ubiquitiniert und durch das Proteasom abgebaut (Holloway et al., 1993). Es wurde als Fusionprotein mit der Glutathion-S-Transferase (GST-Cyclin B) in *Escherichia coli* exprimiert und mit Hilfe von Glutathion-Agarose (Pharmacia, Piscataway, New Jersey) gereinigt. Das in dieser Arbeit verwendete Cyclin B wurde freundlicherweise von M. Rolls und P. Stein zur Verfügung gestellt. Zur Kontrolle des mitotischen Zustandes wurden vor und nach der Reaktion jeweils 1 μ l zur Bestimmung

der Histon H1-Kinaseaktivität abgenommen. Zur Herstellung einer Membranfraktion und einer cytosolischen Fraktion aus dem mitotischen Extrakt wurden 500µl mitotischer Extrakt für 10 Minuten bei 75000rpm, 2°C im 100.3-Rotor zentrifugiert und der Überstand (bestehend aus Cytosol und einem Teil der Membranen) für 30 Minuten, 75000rpm, 2°C im 100.3 Rotor zentrifugiert. Im Überstand befindet sich das Cytosol, das wie üblich eingefroren werden kann. Das Pellet besteht aus einem lockeren Membranenpellet und einem festen, gelblich-klaren Ribosomenpellet. Das Membranenpellet wird in 1ml MWB resuspendiert und für 10 Minuten bei 75000rpm, 2°C im 100.3-Rotor zentrifugiert. Das erhaltene Membranpellet wird in einem kleinen Volumen MWB resuspendiert und wie üblich eingefroren.

2.5. Bestimmung der Histon H1-Kinaseaktivität

1µl der zu bestimmenden Probe werden mit 10µl EB-Puffer gemischt und können bis zur H1-Kinase Bestimmung eingefroren gelagert werden. Für die eigentliche Reaktion werden 6µl eines H1-Kinase Reaktionsansatzes, der 0.5mg/ml Histon H1 (Promega, Madison, Wisconsin), 50µM ATP, 0.2µCi/µl [γ 32 P]-ATP (Amersham, Arlington Heights, Illinois), 0.1% NP-40 (Boehringer Mannheim, Indianapolis, Indiana), und PI in EB-Puffer enthält, zu den 10µl der zu bestimmenden Probe gegeben, für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und die Reaktion durch die Zugabe von 40µl SDS-Probenpuffer gestoppt. Die Proben wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und die Phosphorylierung des Histons H1 mit Hilfe eines "Phosphorimagers" (BAS1000, Fuji) quantifiziert.

2.6. Präparation von Spermien-Chromatin

Die Präparation von Spermien-Chromatin folgt genau dem Protokoll von A. Murray, 1991. Sechs männliche *X.laevis* werden etwa eine Woche vor der Präparation subkutan mit 50 Einheiten "human chorionic gonadotropin" gespritzt. Eine Woche später werden sie durch 2.5 g/l Tricain(3-aminobenzoessäure-ethylester) im Wasser getötet, der Testis entfernt, mit 50 ml HSP-Puffer (250 mM Saccharose, 15 mM Hepes pH 7.4, 80 mM KCl, 15 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5 mM Spermidin, 0.2 mM Spermin, 10µg/ml Leupeptin, 0.3mM PMSF) gewaschen, und in 30 ml desselben Puffers durch Reiben zwischen den aufgerauhten Flächen zweier Objektträger aufgeschlossen. Die freigesetzten Spermien werden durch grobmaschiges Tuch filtriert, um Bindegewebe und Blutgefäße zu entfernen, und für 10 Minuten bei 2000 rpm, 2°C in einem 50ml Zentrifugengefäß, das unten spitz zuläuft, zentrifugiert. Die Spermien befinden sich im Pellet und wurden nochmals resuspendiert und zentrifugiert. Anschließend werden die Spermien in 4ml HSP-Puffer resuspendiert und zum Entfernen der Zellmembranen und Kernhülle 200µl 10mg/ml Lysolecithin zugegeben. Nach 5-10 Minuten der Inkubation auf Eis werden 20-30 ml HSP-Puffer mit 3% BSA zum Binden des Detergens zu der Reaktion gegeben und das Spermien-Chromatin für 10 Minuten bei 2000 rpm, 2°C zentrifugiert. Das Pellet wird in 20ml HSP-Puffer mit 0.3% BSA resuspendiert und wiederum abzentrifugiert. Anschließend wird das Chromatin in 2-3ml HSP-Puffer mit 0.3% BSA und 30% Glycerin resuspendiert, in kleinen Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

2.7. Bildung von Zellkernen im *Xenopus in vitro* System

Zur Bildung von Zellkernen wurden 0.3µl Spermien-Chromatin, 10µl Eiextrakt und 0.5µl eines Energie-regenerierenden Systems (Endkonzentrationen: 1 mM ATP, 0.5 mM GTP, 20 mM Creatinphosphat, 0.1 mg/ml Creatinkinase, alle bezogen bei Boehringer Mannheim) durch mehrmaliges Pipettieren miteinander vermischt und für die in den Abbildungen angegebenen Zeiten bei Raumtemperatur inkubiert. Wurde anstelle des Extraktes Cytosol mit den leichten und schweren Membranen verwendet, so wurden 10µl Cytosol verwendet und die Mengen der Membranen für jede Präparation titriert, so daß

sich möglichst viele, große Zellkerne bildeten. Optimale Mengenverhältnisse der Membranen lagen in der Regel bei 1µl der leichten Membranen und 0.3µl der schweren Membranen auf 10µl Cytosol. Im vereinfachten System zur Kernbildung wurden nur Cytosol und leichte Membranen verwendet. Auch hier wurde für jede Präparation der leichten Membranen die optimale Menge an Membranen bestimmt, bei der sich die meisten Zellkerne mit einer geschlossenen Kernhülle nach 60 Minuten Inkubation bildeten. Die vereinfachte Kernbildungsreaktion enthielt außerdem 2mg/ml Polyglutamat (80 kDa durchschnittliches Molekulargewicht, Sigma) zur Dekondensation des Chromatins. Wurde die Kernbildungsreaktionen ohne Cytosol durchgeführt, wurde es durch die gleiche Menge MWB ersetzt.

Nach unterschiedlichen Zeiten wurden 1-2µl der Reaktion mit 1-2µl einer Färbelösung (10µg/ml Hoechst 33258, 20µg/ml 3,3'-dihexadecyloxacarbocyanin perchlorat (DHCC, Molecular Probes, Eugene, Oregon) in MWB) gemischt und mit einem "Axioplan 2" Fluoreszenz-Mikroskop (Zeiss, Jena) beobachtet. Zur Dokumentation wurden Bilder mit einer angeschlossenen digitalen Kamera (Sony, Modell DCX-370-MD) und einem PC mit der "Northern Exposure" Software aufgenommen. Alternativ wurden mit einer angeschlossenen Kamera Fotos aufgenommen und die Filmnegative mit einem Dia-Scanner (Sprint Scan 35, Polaroid) digitalisiert. Die so gespeicherten Bilder wurden mit Hilfe der CANVAS-Software arrangiert und mit einem Videoprinter (Fujix, Fuji) gedruckt.

Um die hochwertigen Bilder der Abbildungen 7 bis 11 zu erhalten, wurde eine hochauflösende, auf -25°C gekühlte CCD-Kamera (Applied Precision Inc., Issaquah, Washington) an einem invertierten Axiovert S100TV-Fluoreszenzmikroskop (Zeiss) verwendet. Bilder wurden in 0.2µm Schritten senkrecht zur Focussierungsebene aufgenommen und mit Hilfe der Delta Vision®-Software auf einem O2-Computer (Silicon Graphics, Californien) aufgearbeitet. Für die Bildverarbeitung war es notwendig, daß sich die Zellkerne während der Aufnahme nicht bewegten.

2.8. Bindung von Membranvesikeln an das dekondensierte Chromatin

Die Bindungsreaktion wurde ohne Cytosol und in Gegenwart von GTP γ S durchgeführt, um die Bildung einer Kernhülle zu verhindern. Die Reaktion enthielt 0.3 μ l Spermien-Chromatin in 10 μ l MWB, ein Energie-regenerierendes System, 1mM GTP γ S, 2mg/ml Polyglutamat (mittleres Molekulargewicht 80kDa) sowie 1 μ l der leichten oder schweren Membranfraktion. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Membranen mit 0.1% Octadecyl-Rhodamin in MWB gefärbt und im Fluoreszenz-Mikroskop analysiert.

2.9. ER-Bildung im *Xenopus in vitro* System

Zur Bildung des ER wurden in der Regel 10 μ l Cytosol mit 1 μ l der leichten Membranen und 0.5 μ l des Energie-regenerierenden Systems gemischt und für 30-60 Minuten bei Raumtemperatur in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß inkubiert. Danach wurde 1 μ l der Reaktion vorsichtig in 2 μ l Färbelösung, 0.1% (v/v) Octadecyl-Rhodamin oder mit 20 μ g/ml 3,3'-dihexadecyloxacarbocyanin perchlorat, DHCC, (beide Molecular Probes; Terasaki, 1989) in MWB, auf einem Objektträger gegeben und im Fluoreszenz-Mikroskop beobachtet. Der Reaktionsansatz durfte nicht stark mit der Färbelösung gemischt werden, da sonst die Netzwerke zerstört wurden. Die beiden verwendeten hydrophoben, fluoreszierenden Farbstoffe geben identische Ergebnisse. Um die Netzwerke auf der Oberfläche eines Objektträgers anhaften zu lassen, wurden in die Vertiefung eines Objektträgers (ICN Pharmaceuticals, Costa Mesa, Californien) 20 μ l 5% BSA in MWB für 5-10 Minuten gegeben, um die Glasoberfläche mit BSA zu beschichten, und anschließend 5-10 μ l einer ER-Bildungsreaktion in die Vertiefung gegeben. Nach 30-60 Minuten der Inkubation in einer abgeschlossenen Kammer mit hoher Luftfeuchtigkeit wurden die anhaftenden Membrannetzwerke zweimal mit 150 μ l MWB gewaschen, mit 10 μ l der oben angegebenen Färbelösung für 10 Sekunden gefärbt und nach zweimaligem Waschen mit 150 μ l MWB im Fluoreszenzmikroskop beobachtet. Nach dem Waschen sind die anhaftenden Membrannetzwerke noch für 5-15 Minuten stabil, danach zerfallen die Membrantubuli zu Membranvesikeln.

2.10. Manipulationen der ER-Bildung

Zur Depletion von ATP wurden Hexokinase (0.2 Einheiten/ μ l, Boehringer), und Glukose (50mM) zur ER-Bildungsreaktion gegeben. GTP γ S (Boehringer) wurde in einer Konzentration von 1mM eingesetzt.

Zur NEM-Behandlung des Cytosols wurde NEM frisch in Wasser gelöst (100mM) und in einer Konzentration von 10mM eingesetzt. Nach einer 15-minütigen Inkubation auf Eis wurde nicht umgesetztes NEM für 30 Minuten mit 20mM DTT inaktiviert und das Cytosol in der ER-Bildung eingesetzt. Die Membranen wurden 15 Minuten auf Eis mit 5mM NEM behandelt. Danach wurde 10mM DTT zugegeben, 15 Minuten auf Eis inkubiert, die Membranen pelletiert (10 Minuten, 100000rpm, 2°C, 100.3-Rotor, Beckman) und im Ausgangsvolumen in MWB resuspendiert. Als Kontrolle wurde NEM vor der Zugabe zu den Membranen mit DTT inaktiviert.

Zur Trypsin-Behandlung wurden 10 μ l Membranen in 100 μ l MWB mit 1mg/ml oder 0.01mg/ml Trypsin (Sigma) oder als Kontrolle ohne Trypsin für 30 Minuten auf Eis behandelt und die Protease durch Zugabe von 1ml 1mM PMSF in MWB für 10 Minuten auf Eis inaktiviert. Nach Sedimentation der Membranen für 10 Minuten bei 75000rpm, 2°C im 100.3-Rotor wurden die Membranen im Ausgangsvolumen MWB resuspendiert und in der ER-Bildung eingesetzt. Zur Proteinase K Behandlung nach der Bildung der Membrannetzwerke wurde zur Färbelösung 1.5mg/ml Proteinase K (Boehringer) gegeben und wie üblich zu 2 μ l dieser Lösung 1 μ l einer ER-Bildungsreaktion gegeben und nach 5-15 Minuten im Fluoreszenz-Mikroskop analysiert.

Calcium wurde als CaCl₂ in einer Konzentration von bis zu 1mM in der ER-Bildungsreaktion eingesetzt. Bei der nachträglichen Zugabe von CaCl₂ wurde es in einer Konzentration von 2mM in die Färbelösung gegeben, und wie üblich zu 2 μ l dieser Lösung 1 μ l einer ER-Bildungsreaktion gegeben und im Fluoreszenz-Mikroskop analysiert.

Um Mikrotubuli bei der ER-Bildung zu analysieren, wurden 0.2mg/ml Rhodamin-markiertes Tubulin (Molecular Probes; Hyman et al., 1991) und 20 μ M Taxol (Molecular Probes) zu der ER-Bildungsreaktion gegeben und die Reaktion für 45 Minuten auf einem Objektträger durchgeführt. Der Waschpuffer enthielt ebenfalls 20 μ M Taxol, um die gebildeten Mikrotubuli zu stabilisieren. Die Membranen wurden mit 20 μ g/ml 3,3'-dihexadecyloxacarbocyanin perchlorat gefärbt. Anschließend wurden die Mikrotubuli im Rhodamin-Kanal und die Membranen im Fluorescein-Kanal des Fluoreszenz-Mikrokops analysiert.

Zur Verhinderung der Bildung von Mikrotubuli wurden Nocodazol (bis zu 0.2mg/ml, Stammlösung 10mg/ml in DMSO), Colchicin (bis zu 100 μ M, Stammlösung 5mM in DMSO) oder Vinblastin (bis zu 200 μ M, Stammlösung 10mM in Wasser) zu einer ER-Bildungsreaktion gegeben.

Zur Verhinderung der Bildung von Actinfilamenten wurde Latrunculin A (Molecular Probes) bis zu einer Konzentration von 200 μ M (Stammlösung 20mM in DMSO) zur Reaktion gegeben.

2.11. Tubulin-Depletion des Cytosols

Tubulin wurde auf zwei verschiedene Methoden aus dem Cytosol depletiert. In der ersten wurde die Polymerisation des freien Tubulins durch die Zugabe kurzer Mikrotubuli und Taxol stimuliert. Die Mikrotubuli wurden anschließend durch Zentrifugation vom Cytosol abgetrennt. Die verwendeten kurzen Mikrotubuli mit einer durchschnittlichen Länge von 2 μ m wurden durch Inkubation von 5mg/ml Tubulin (Cytoskeleton Inc., Denver, Colorado), 1mM GTP, 30% Glycerin in BRB80 für 10 Minuten bei 35°Celsius erhalten und können nach Zugabe von 20 μ M Taxol bei Raumtemperatur für etwa 2 Wochen gelagert werden. BRB80-Puffer besteht aus 80mM PIPES (Piperazine-N,N'-bis[2-ethansulfonsäure]) pH 6.8, 1mM MgCl₂, 1mM EGTA. Zu 100 μ l Cytosol wurden 1 μ l der

2µm-langen Mikrotubuli, 1mM Mg²⁺ /GTP, 5µM Taxol und ein energieregenerierendes System gegeben und für 5 Minuten bei 25°C inkubiert. Nach 5 Minuten wurden weitere 15µM Taxol zugegeben und für 25 Minuten bei 25°C inkubiert. Anschließend wurden die polymerisierten Mikrotubuli für 20 Minuten bei 75000rpm, 22°C im 100.3-Rotor abzentrifugiert und das Tubulin-depletierte Cytosol im Überstand erhalten. Die zweite Methode der Tubulin-Depletion macht sich zunutze, daß Tubulin mit Vinblastin kristalline Aggregate bildet, die vom restlichen Cytosol durch Zentrifugation abgetrennt werden können (Palacek et al., 1982). Es wurden 50µl Cytosol mit 100µM Vinblastin für 30 Minuten auf Eis inkubiert, anschließend für 20 Minuten bei 75000rpm, 2°C im 100.3-Rotor zentrifugiert und das Tubulin-depletierte Cytosol aus dem Überstand abgenommen. Die Tubulin-Depletion des Cytosols wurde im "Western Blot" quantifiziert. Mit der ersten Methode werden 90-95% des Tubulins aus dem Cytosol entfernt, mit der zweiten Methode mehr als 95%.

2.12. Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Zur Immunfluoreszenz wurden die Membrannetzwerke auf der Oberfläche eines Objektträgers gebildet und danach mit 1% Glutaraldehyd in MWB ohne DTT für 15 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Antikörper gegen das ER-Markerprotein Trap α (Görlich et al., 1989) und der monoklonale Antikörper Mab414 (BAbCo, Berkeley, California) gegen Kernporenproteine wurden 1:50 eingesetzt. Rhodamin-gekoppeltes ConcanavalinA (ConA) und "Oregon-Grün"-gekoppeltes "Wheat germ agglutinin" (WGA) (beide Molecular Probes) wurden in einer Konzentration von 0.1mg/ml eingesetzt. Bei dieser Konzentration werden ER und Golgi-Apparat von Zellkulturzellen etwa gleich stark markiert (Daten nicht gezeigt). Um die Intensität der Fluoreszenz durch ConA und WGA zu vergleichen, wurden Bilder mit gleichen Einstellungen am Mikroskop aufgenommen und identisch bearbeitet.

2.13. Elektronenmikroskopie

Zur Analyse der leichten und schweren Membranen wurden je 5µl der Membranen mit 1ml 1% Glutaraldehyd in MWB ohne Saccharose und DTT für 15 Minuten bei Raumtemperatur fixiert, daraufhin für 5 Minuten bei 14000rpm, 2°C in einer Tischzentrifuge (Eppendorf, Hamburg) zentrifugiert und die Membranen im Pellet viermal mit 1ml 100mM Hepes, pH 7.7, gewaschen. Das Pellet wurde weiter mit 1% OsO₄ behandelt und in Epon/Araldite eingebettet. Die Dünnschnitte wurden mit Uranylacetat und Bleiacetat gefärbt und in einem Elektronenmikroskop (JOEL, 1200EX) analysiert.

Um die Bildung von Zellkernen mittels Dünnschnitt und Negativkontrastierung zu verfolgen, wurden 100µl einer Kernbildungsreaktion 15 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend mit 1ml 50mM Hepes, pH 7.4, 1mM EGTA, 50mM KCl, 2mM Magnesiumacetat, 125mM Saccharose, 1% Glutaraldehyd für eine Stunde auf Eis fixiert. Die fixierten Kerne wurden 1 Minute bei 5000rpm (4500g), 2°C in einem "swing out" Rotor (Nr.11133, Sigma) pelletiert und das Pellet viermal mit 1ml 200mM Hepes, pH 7.4, gewaschen. Das Pellet wurde weiter wie oben behandelt und analysiert.

Um die Bildung der Membrannetzwerke mittels Negativkontrastierung zu verfolgen, wurden 10µl einer ER-Bildungsreaktion auf einem mit Nitrocellulose beschichteten Träger gegeben und für 30 Minuten bei Raumtemperatur in einer abgeschlossenen Kammer mit hoher Luftfeuchtigkeit inkubiert. Der Träger wurde anschließend kurz in MWB ohne Saccharose und DTT gewaschen, daraufhin für 15 Minuten in MWB mit 1% Glutaraldehyd fixiert, und nach erneutem Waschen in 200mM Hepes, pH 7.6, mit Uranylacetat gefärbt.

2.14. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western Blot

Proteine wurden für 15 Minuten in SDS-Probenpuffer (4% SDS (Fisher Scientific, Pittsburg, PA), 135mM Tris pH 8-10, 20% Glycerin, etwas Bromphenolblau) bei 70°C gelöst und durch eindimensionale Gelelektrophorese (Laemmli, 1970) bei 50-70mA aufgetrennt. Es wurden Gele mit einer Acrylamid-Konzentration im Trenngel von 10% oder Gradientengele mit einer Konzentration von 7.5-17.5% Acrylamid verwendet. Nach

dem Lauf wurden die Proteine in 10% Essigsäure, 40% Methanol, 0.1% (w/v) Coomassie Brilliant Blau G250 gefärbt, in demselben Puffer ohne Coomassie entfärbt und mit einer digitalen Kamera (Nikon, Melville, New York) und zugehöriger Software aufgenommen. Beim Western Blot wurden die Gele nach der SDS-PAGE kurz in Transferpuffer (192mM Glycin, 25mM Tris-Base, pH8.3, 0.1% SDS, 20% Methanol (Fisher Scientific)) gelegt und anschließend im "semi-dry"-Verfahren zwischen 8 Lagen Filterpapier mit 2mA/cm² für eine Stunde auf eine Nitrocellulose-Membran (Schleicher und Schuell, Keene, New Hampshire) transferiert. Die Nitrocellulose-Membran wurde in TBT-Puffer (50mM Tris, pH 7.5, 150mM NaCl, 0.1% (v/v) Tween20) mit 5% (w/v) Trockenmilch für 15 Minuten inkubiert, gefolgt von dem jeweiligen ersten Antikörper in demselben Puffer. In dieser Arbeit wurden Antikörper gegen die α -Untereinheit von Tubulin (DM1 α , Sigma), Sec61 α (Görlich et al., 1992), Trap α und β (Görlich et al., 1989) und die 12kDa Untereinheit der Signalpeptidase, SP12 (Kalies et al., 1997) im Western Blot verwendet. Der zweite Antikörper war ein Peroxidase-gekoppelter Anti-Kaninchen oder Anti-Maus Antikörper und wurde mittels verstärkter Chemielumineszenz, ECL (Amersham), detektiert. Zur Bestimmung der Depletion von Tubulin wurde ein radioaktiv markierter zweiter Antikörper verwendet, der mit Hilfe eines "Phosphorimagers" quantifiziert wurde.

2.15. Fraktionierung des Cytosols

Zur Fraktionierung des Cytosols durch Anionen-Austauscherchromatographie wurden 5ml Cytosol direkt vor der Fraktionierung mit 10 Volumen MWB verdünnt und eine Stunde bei 50000rpm, 2°C im Ti50.2-Rotor (Beckman) zentrifugiert. Der Überstand wurde an eine Säule mit 10ml "DEAE-Sepharose fast flow" (Pharmacia) gebunden und die gebundenen Proteine schrittweise mit MWB + 100mM Kaliumacetat, MWB + 200mM Kaliumacetat und MWB + 500mM Kaliumacetat eluiert. Die Elutionsfraktionen wurden mit MWB ohne Kaliumacetat auf eine Endkonzentration von 100mM Kaliumacetat

verdünnt und alle Fraktionen durch Ultrafiltration (Centriprep 10, Millipore, Bedford, Massachusetts) aufkonzentriert.

Bei der Gelfiltration wurde 1ml Cytosol direkt vor dem Auftragen auf die Säule für 30 Minuten bei 75000rpm, 2°C im 100.3-Rotor (Beckman) zentrifugiert, um durch das Einfrieren entstandene Aggregate abzutrennen. Der Überstand wurde auf einer Superose12 Gelfiltrationssäule (Pharmacia) in Laufpuffer (25mM Hepes pH 7.6, 150mM Kaliumacetat, 2mM Magnesiumacetat) aufgetrennt, und die erhaltenen 1ml-Fraktionen durch Ultrafiltration (Microcon10, Millipore) konzentriert. Die aufkonzentrierten Fraktionen wurden wie das Cytosol in der ER-Bildungsreaktion getestet, und konnten wie dieses in Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert werden.

3. ERGEBNISSE

3.1. Die Bildung der Zellkernhülle *in vitro*

3.1.1 Die Zellkernbildung im *Xenopus* Eiextrakt

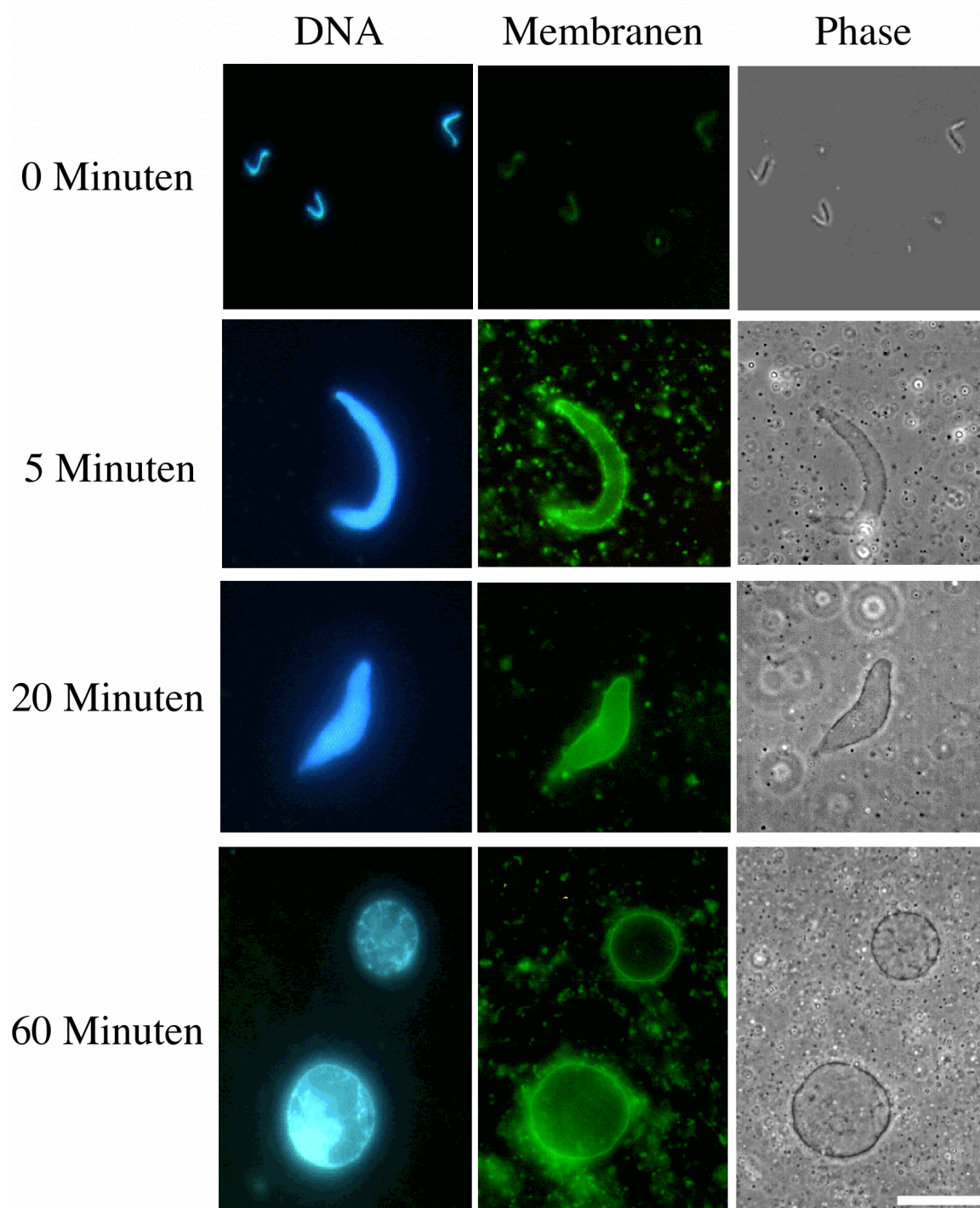
Ausgangspunkt dieser Arbeit war die Etablierung eines *in vitro* Systems zur Bildung von Zellkernen, das den Extrakt der Eier von *X.laevis* benutzt. Wird der Eiextrakt mit Spermien-Chromatin von *X.laevis* für 30-60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, so bilden sich Zellkerne, die in Größe und Form den *in vivo* gebildeten Zellkernen ähneln. Wie diese besitzen sie eine innere und äußere Kernmembran, Kernporen und eine Kernlamina und sind zu Kernimport und semi-konservativer DNA-Replikation in der Lage (Wilson und Wiese, 1996). Die Bildung der Zellkerne kann im Fluoreszenz-Mikroskop verfolgt werden (Abb. 2). Dazu wird die DNA des Spermien-Chromatins mit bis-Benzimid ("Hoechst") gefärbt und die Membranen werden mit einem hydrophoben, fluoreszierenden Farbstoff sichtbar gemacht. Die Kernhülle ist außerdem im Phasenkontrast-Bild zu sehen.

Zu Beginn der Reaktion (Abb. 2, 0 Minuten) ist das Spermien-Chromatin noch stark kondensiert. Jedes S-förmige Chromatin enthält den haploiden Chromosomensatz eines Spermien-Zellkerns. Wenige Minuten später ist es bereits dekondensiert und gebundene Membranvesikel sind als diffuse, rauhe Umrandung des Chromatins zu erkennen (Abb. 2, 5 Minuten). Nach 20 Minuten sind die gebundenen Membranvesikel bereits zum Großteil miteinander fusioniert. Dies kann an der scharfen, von der abgeflachten Kernhülle hervorgerufenen Linie um das Chromatin im Phasenkontrast-Bild und im Fluoreszenz-

Abb. 2. Die Bildung von Zellkernen im *Xenopus* Eiextrakt

Zellkerne wurden durch Inkubation eines Eiextraktes mit Spermien-Chromatin und einem Energie-regenerierenden System erhalten. Nach verschiedenen Zeiten der Inkubation (0, 5, 20 und 60 Minuten) wurde ein Aliquot der Reaktion mit einer Färbelösung vermischt und im Fluoreszenz-Mikroskop analysiert. Die DNA wurde mit Hoechst gefärbt (linke Spalte, "DNA") und die Membranen mit DHCC, einem hydrophoben, fluoreszierenden Farbstoff (mittlere Spalte, "Membranen"). In der rechten Spalte sind die sich bildenden Zellkerne im Phasenkontrastbild zu sehen (rechte Spalte, "Phase"). Maßstab für alle Bilder: 20µm.

Abb. 2



Bild, nach Anfärben der Membranen mit dem hydrophoben, fluoreszierenden Farbstoff, erkannt werden (Abb. 2, 20 Minuten). Der sich bildende Zellkern fängt an, sich abzurunden. Nach 60 Minuten sind die Zellkerne kugelförmig und die geschlossene Kernhülle ist als scharfe Linie zu erkennen (Abb.2, 60 Minuten).

3.1.2. Fraktionierung des Eiextraktes in Cytosol und Membranfraktionen

Um den Prozeß der Bildung der Kernhülle biochemisch besser zugänglich zu machen, wurde der Eiextrakt in eine cytosolische und zwei Membranfraktionen getrennt (siehe Material und Methoden). Die beiden Membranfraktionen unterscheiden sich durch ihre Dichte und werden deshalb als "leichte" und "schwere" Membranen bezeichnet.

Wie in der Einleitung beschrieben, kann die Zellkernbildung im *Xenopus in vitro* System in eine Bindungsreaktion, bei der Membranvesikel an das dekondensierte Spermien-Chromatin binden, und einen darauffolgenden Fusionsschritt, bei dem die Chromatinkomplexen gebundenen Membranvesikel miteinander fusionieren und so die Kernhülle bilden, getrennt werden (Newport und Dunphy, 1992).

Die leichte und schwere Membranfraktion wurden zuerst auf ihre Fähigkeit getestet, an Chromatin zu binden (Abb. 3A). Das Spermien-Chromatin wurde durch Polyglutamat dekondensiert und die Bindungsreaktion ohne Cytosol und in Gegenwart von GTP γ S durchgeführt, damit sich keine Kernhülle bildet. Dabei zeigte sich, daß nur Membranvesikel aus der leichten Membranfraktion an das Chromatin binden können (Abb. 3A). Als nächstes wurde untersucht, ob mit dem fraktionierten Extrakt, d.h. mit der cytosolischen Fraktion und beiden Membranfraktionen die Bildung großer Zellkerne rekonstituiert werden kann. Abb. 3B zeigt, daß große Zellkerne gebildet werden, wenn alle drei Fraktionen zusammengegeben werden. Die leichten Membranen bilden zusammen mit dem Cytosol nur kleine Zellkerne, während die schweren Membranen zusammen mit dem Cytosol keine Zellkerne bilden (Abb.3B und Daten nicht gezeigt).

Da sich die leichten und schweren Membranen in ihrem Verhalten bei der Kernbildung unterscheiden, wurde ihre Zusammensetzung näher charakterisiert (Abb. 4). Beide Membranfraktionen wurden im "Westernblot" mit Antikörpern gegen Markerproteine des ER getestet. Nur die leichten Membranen reagieren mit Antikörpern gegen diverse Markerproteine des ER (Abb. 4A). Für Proteine der inneren Kernmembran, des Golgi-

Abb. 3

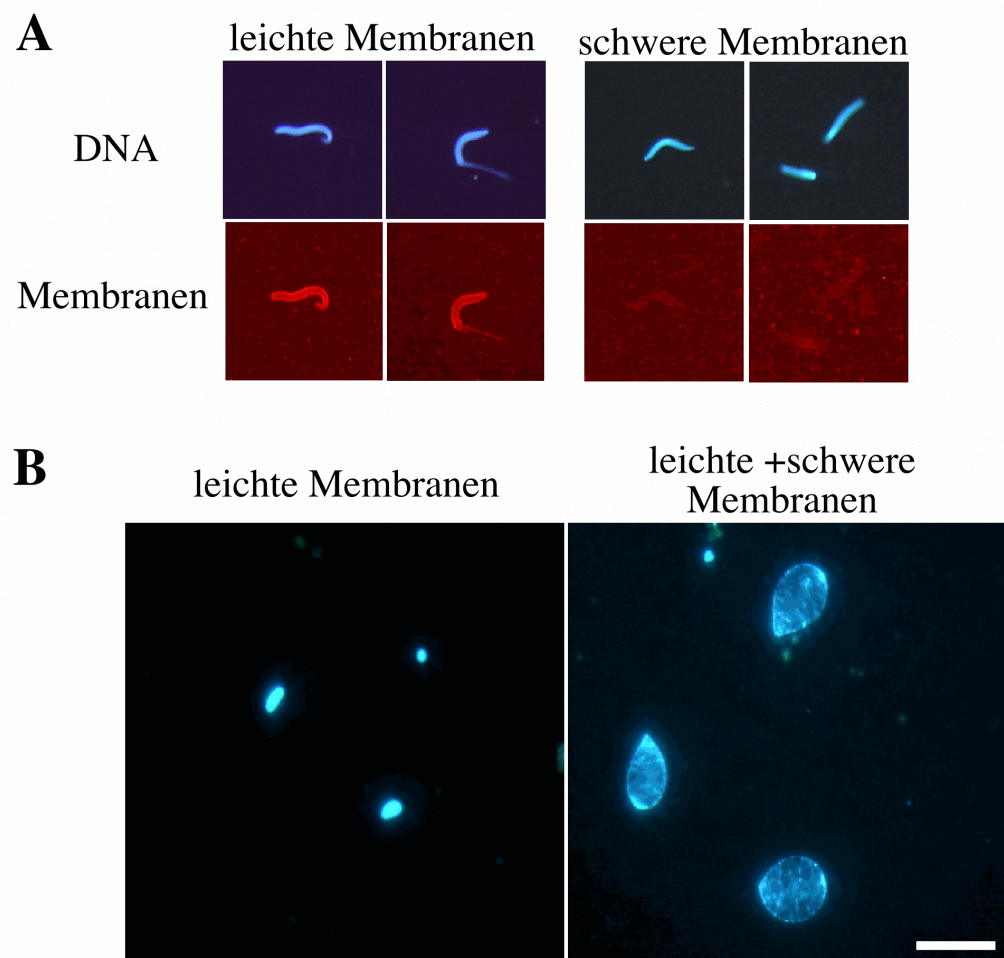


Abb. 3. Chromatinbindung und Kernbildung mit den leichten und schweren Membranen

(A) Leichte oder schwere Membranen wurden in einer Bindungsreaktion mit Spermien-Chromatin inkubiert und die Bindung der Membranen nach Färben des Chromatins mit Hoechst (DNA) und der Membranen mit Octadecyl-Rhodamin (Membranen) im Fluoreszenz-Mikroskop analysiert.

(B) Kernbildungsreaktionen wurden mit Cytosol, Spermien-Chromatin und einem Energie-regenerierenden System, sowie entweder den leichten Membranen allein (linkes Bild) oder den leichten Membranen und den schweren Membranen durchgeführt (rechtes Bild). Die Zellkerne wurden durch Färben der DNA mit Hoechst im Fluoreszenz-Mikroskop analysiert.

Maßstab für alle Bilder: 60µm.

Apparates oder der Plasmamembran standen keine Antikörper zur Verfügung. Im elektronenmikroskopischen Bild nach Dünnschnitt und Negativkontrastierung stellt sich die leichte Membranfraktion als eine relativ homogene Vesikelpopulation mit Vesikeldurchmessern zwischen 100nm und 200nm dar (Abb. 4B). Die schwere Membranfraktion enthält überwiegend Mitochondrien und nur wenige kleine Vesikel (Abb. 4B).

Es ist offen, wie die schweren Membranen, die nicht an das Chromatin binden und folglich auch allein mit dem Cytosol keine Zellkerne bilden können, an der Bildung großer Zellkerne beteiligt sind. Denkbar ist, daß Membranvesikel der schweren Membranfraktion mit der äußeren Kernmembran der kleinen Zellkerne fusionieren, und so die Vergrößerung der Kernhülle ermöglichen. Der Effekt könnte aber auch indirekt zum Beispiel von den Mitochondrien der schweren Membranfraktion verursacht sein.

3.1.3. Ein vereinfachtes *in vitro* System der Zellkernbildung

Die Trennung des Extraktes in Cytosol und Membranfraktionen ist eine Voraussetzung für die Identifizierung cytosolischer Proteine, die an der Bildung der Kernhülle beteiligt sind, durch Fraktionierung des Cytosols. An der bisher beschriebenen Bildung großer Zellkerne sind viele cytosolische Proteine beteiligt, die nur indirekt etwas mit der Bildung der Kernhülle zu tun haben. Die Dekondensation des Chromatins und die Assemblierung von Nukleosomen erfolgt durch Nucleoplasmin und andere cytosolische Proteine. Der Kernimport, der für die Bildung großer Zellkerne notwendig ist, benötigt eine Reihe bekannter cytosolischer Faktoren. Bisher sind keine cytosolischen Proteine bekannt, die direkt an der Bildung der Kernhülle aus den Chromatin-gebundenen Membranvesikeln beteiligt sind. Da es für die Fraktionierung des Cytosols von Vorteil ist, wenn der untersuchte Prozeß nur einen oder wenige Faktor(en) aus dem Cytosol benötigt, haben wir versucht, die Kernbildungsreaktion zu vereinfachen.

Um die Dekondensation des Chromatins unabhängig vom Cytosol zu machen, wurde Polyglutamat zu der Kernbildungsreaktion gegeben. Polyglutamat allein ist ausreichend,

um die für die Kernbildung notwendige Dekondensation des Chromatins zu bewirken.

Außerdem wurde die schwere Membranfraktion aus der Reaktion weggelassen. Dies führt dazu, daß die in diesem System gebildeten Kerne klein bleiben, die zylindrische Form des dekontensierten Chromatins behalten und ihre Bildung deshalb wahrscheinlich unabhängig vom Kernimport ist.

Abb. 4

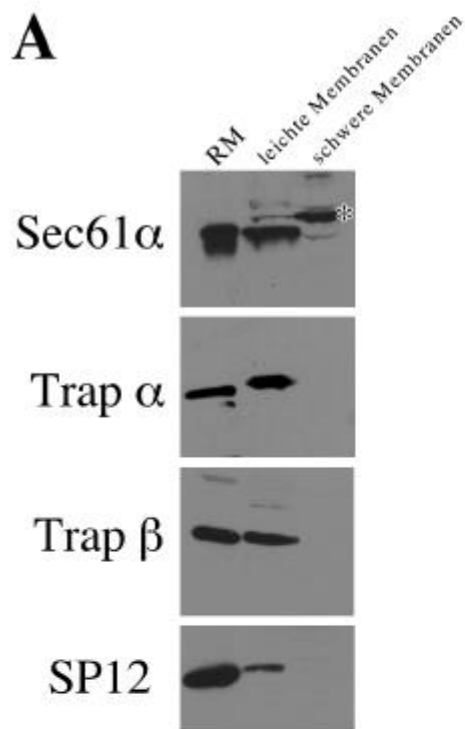
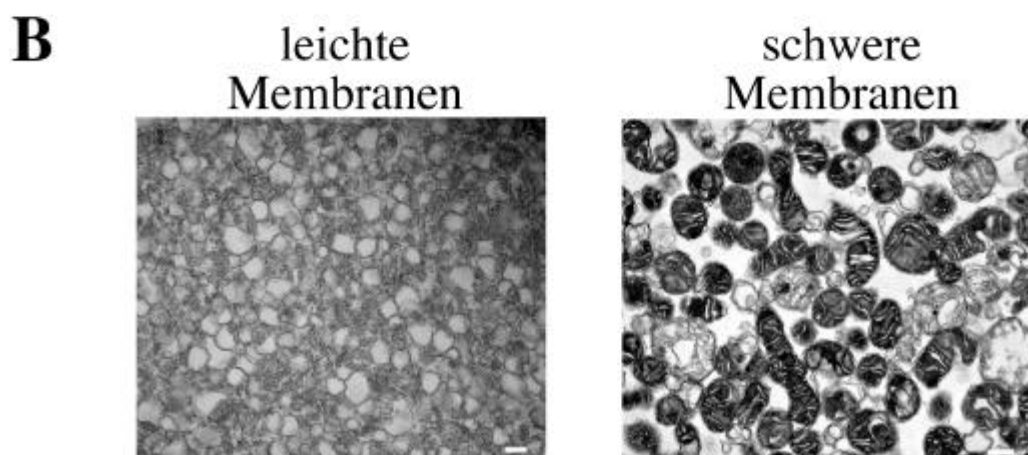


Abb. 4. Analyse der leichten und schweren Membranfraktionen

(A) Die leichten und schweren Membranen wurden im "Western Blot" mit Antikörpern gegen ER-Markerproteine untersucht. Für die Analyse wurden die leichten und schweren Membranen in den relativen Mengen eingesetzt, in denen sie bei der Fraktionierung des Eiextraktes erhalten werden. Die rauen Mikrosomen des Hundepankreas (RM) dienten als Positivkontrolle, da alle eingesetzten Antikörper gegen ER-Proteine aus diesem Gewebe gerichtet sind. TRAP α , β : α - und β -Untereinheit des "Translocon associated protein"; SP12: 12kDa-Untereinheit der Signalpeptidase. Der Stern in dem obersten Bild (Sec61 α) markiert eine Bande, die wahrscheinlich nicht Sec61 α ist.

(B) EM-Bild der leichten und schweren Membranen nach Negativkontrastierung und Dünnschnitt. Maßstab: 200nm.



Die vereinfachte Kernbildungsreaktion enthält somit Spermien-Chromatin, die leichte Membranfraktion, Cytosol, ein Energie-regenerierendes System und Polyglutamat (Abb. 5). Nach 100-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur haben die in diesem System gebildeten Zellkerne eine kontinuierliche Kernhülle, die im Phasenkontrast- und Fluoreszenz-Bild an der scharfen Linie erkennbar ist (Abb. 5A, "Phase" und "Membranen", 100 Minuten). Das elektronenmikroskopische Bild nach Dünnschnitt und Negativkontrastierung zeigt, daß die Kernhülle zu diesem Zeitpunkt aus einer inneren und äußeren Kernmembran besteht (Abb. 5B). Nach 10 Minuten und 30 Minuten der Inkubation sind bereits Membranvesikel gebunden, aber sie erscheinen im Phasenkontrast- und Fluoreszenzbild noch als "rauher" Rand um das Chromatin, was darauf hindeutet, daß die Membranvesikel zum Großteil noch nicht miteinander fusioniert sind (Abb. 5A). Die Bildung einer geschlossenen Kernhülle dauert in der vereinfachten Kernbildungsreaktion also länger also bei der Verwendung des kompletten Eiextraktes (vergleiche z.B. Abb. 5A, "30 Minuten" mit Abb. 2, "20 Minuten").

Als nächstes wurde überprüft, ob die vereinfachte Kernbildungsreaktion abhängig von Cytosol ist (Abb. 6). Ohne Cytosol dekondensiert das Spermien-Chromatin durch das Polyglutamat und Membranvesikel können binden (Abb. 6B). Im Gegensatz zu einer Kontrollreaktion mit Cytosol bildet sich keine kontinuierliche Kernhülle (vergleiche Abb. 6B und 6C). Im Fluoreszenz-Mikroskop erscheinen die gebunden Membranen als rauher Rand um das Chromatin. Die Abbildung zeigt außerdem eine Kontrollreaktion ohne Membranen, bei der sich keine Zellkerne bilden (Abb. 6A). Eine oder mehrere cytosolische Aktivitäten sind also für die Bildung der Zellkernhülle in diesem vereinfachten *in vitro* System notwendig.

Eine hilfreiche Eigenschaft der vereinfachten Kernbildungsreaktion ist, daß das Cytosol relativ verdünnt eingesetzt werden kann. Eine eindeutige Kernhülle war noch sichtbar, wenn das Cytosol von 80% auf etwa 25% des Reaktionsvolumens verringert wurde (Daten

Abb. 5. Die Bildung von Zellkernen im vereinfachten Kernbildungssystem

(A) Zellkerne wurden durch Inkubation von Spermien-Chromatin, Cytosol, leichten Membranen, Polyglutamat und einem Energie-regenerierenden System erhalten. Nach den angegebenen Zeiten wurden Aliquots abgenommen und die DNA und die Membranhülle wie in Abb. 2 im Fluoreszenz-Mikroskop analysiert. Maßstab: 20µm.

(B) Das EM-Bild nach Dünnschnitt und Negativkontrastierung zeigt den Zellkern nach einer 100-minütigen Kernbildungsreaktion. Maßstab: 200nm.

Abb. 5

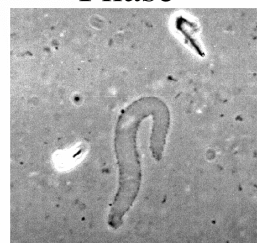
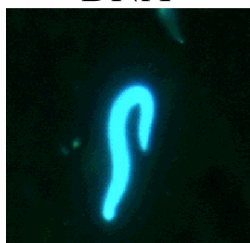
A**Membranen
+
Cytosol**

DNA

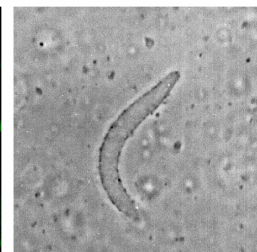
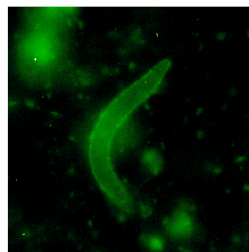
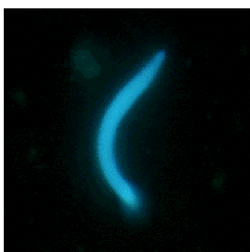
Membranen

Phase

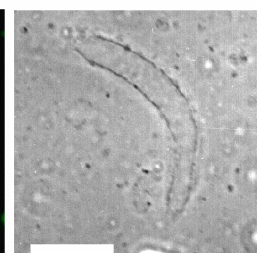
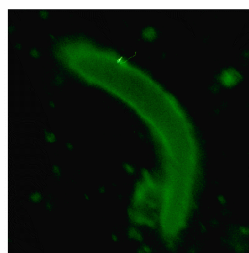
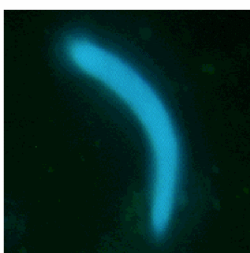
10 Minuten



30 Minuten



100 Minuten

**B**

EM-Bild

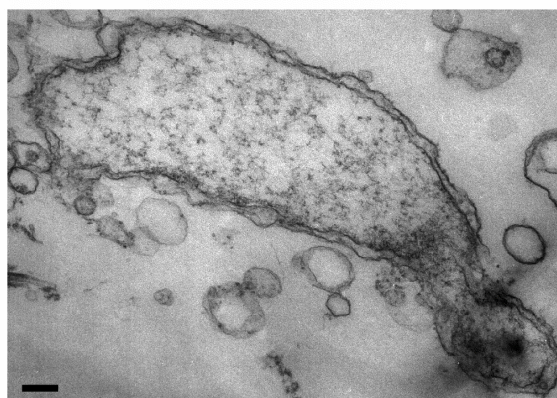


Abb. 6

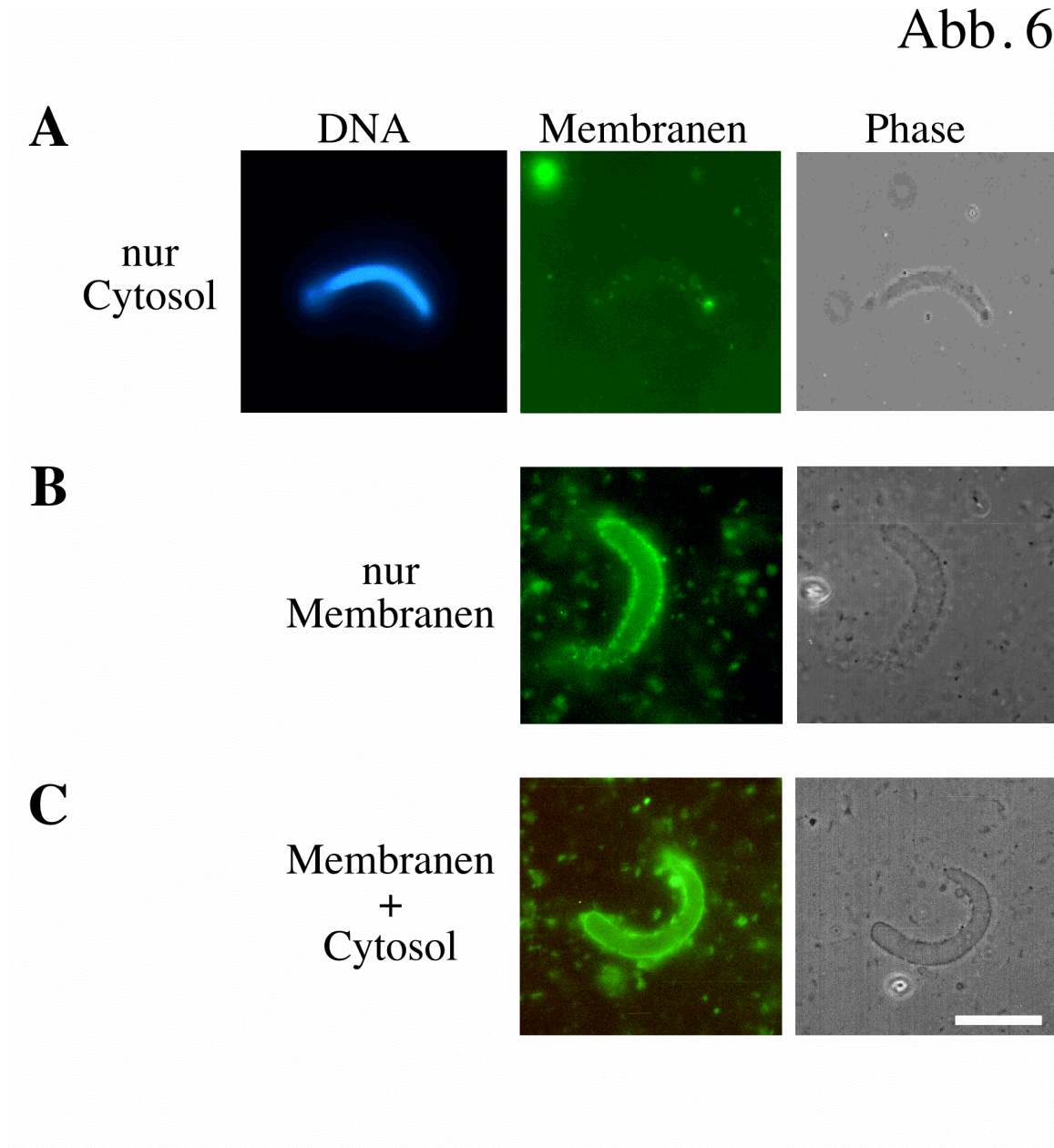


Abb. 6. Die Bildung von Zellkernen im vereinfachten Kernbildungssystem benötigt Cytosol

Die vereinfachte Kernbildungsreaktion wurde entweder ohne Membranen (A) oder ohne Cytosol (B) für 90 Minuten bei Raumtemperatur durchgeführt. Eine Kontrollreaktion mit Membranen und Cytosol ist in (C) gezeigt. Die Analyse der Ergebnisse erfolgte wie in Abb. 2. Maßstab für alle Bilder: 20µm.

nicht gezeigt); um große Zellkerne zusammen mit der schweren Membranfraktion zu erhalten, muß das Cytosol mehr als etwa 75% des Reaktionsvolumens ausmachen. Die Verdünnung des Cytosols, bei der sich noch deutlich Kernhüllen bilden können, kann als Maß für die Konzentration der cytosolischen Aktivität(en) dienen. Ein weiterer Vorteil ist die bessere Reproduzierbarkeit des vereinfachten Systems. Während alle getesteten Präparationen von Cytosolen und leichten Membranen in der vereinfachten Kernbildungsreaktion aktiv waren, bildeten nur etwa die Hälfte davon große Zellkerne in Gegenwart der schweren Membranfraktion.

Die vereinfachte Kernbildungsreaktion erfüllt also eine Reihe von Voraussetzungen, die für die Identifizierung der an der Bildung der Kernhülle beteiligten cytosolischen Aktivität(en) nützlich sind: Sie stellt keine überflüssigen Anforderungen an das Cytosol, wie die Dekondensation des Chromatins oder den Kernimport, sie ist gut reproduzierbar und das Cytosol kann relativ verdünnt eingesetzt werden.

3.1.4. Ein neuer Schritt bei der Bildung der Zellkernhülle

In den bisherigen Experimenten ist der Unterschied zwischen Chromatin-gebundenen Membranvesikeln und einer kontinuierlichen Kernhülle relativ gut ersichtlich. Genauere Details als eine diffuse, rauhe Umrandung um das Chromatin in dem einen Fall und eine scharfe Linie in dem anderen Fall sind jedoch schwer zu erkennen. Um die Bildung der Kernhülle genauer verfolgen zu können, wurde im folgenden eine hochauflösende CCD-Kamera zur Bildaufnahme verwendet und die Qualität der erhaltenen Bilder durch anschließende Bildverarbeitung weiter verbessert. Mit Hilfe der Bildverarbeitung werden zum einen Unschärfen des Bildes herausgerechnet, die durch die Mikroskopoptik entstehen. Zum anderen können Bilder eines sich bildenden Zellkerns, die in Fokussierungsebenen mit einem Abstand von $0.2\mu\text{m}$ aufgenommen wurden, zu einem dreidimensional erscheinenden Bild des Objektes rekonstruiert werden. Durch den Einsatz dieser Technik konnte die Bildung der Zellkernhülle im vereinfachten Kernbildungssystem sehr gut verfolgt und ein neuer Schritt bei der Bildung der Kernhülle identifiziert werden.

Die Abbildungen 7 bis 11 zeigen die Bilder von der Entstehung einer Kernhülle in der vereinfachten Kernbildungsreaktion, die mit Hilfe der hochauflösenden Kamera und anschließender Bildverarbeitung erhalten wurden. Nach zehn Minuten sieht man Membranen in Form von kleinen Flächen auf der Chromatinoberfläche (Abb.7, Pfeile). Die kleinen Flächen sind zum Teil durch tubuläre Membranstrukturen verbunden. Die Abbildungen 7A und 7B zeigen Aufnahmen in unterschiedlichen Fokussierungsebenen desselben Objektes, die in ihrer Qualität bereits durch Bildverarbeitung verbessert sind. Die Abb. 7C stellt eine dreidimensionale Rekonstruktion vieler solcher Bilder desselben Objektes dar. Abb. 7D und 7E zeigen weitere Beispiele der Kernhüllenbildung nach zehn Minuten. Nach 30 Minuten ist die Bildung der Kernhülle bereits weiter fortgeschritten (Abb. 8). Größere, flache Membranschichten bedecken die Oberfläche des Chromatins wie ein Flickenteppich. Wiederum zeigen Abb. 8A und 8B Aufnahmen desselben Objektes in zwei unterschiedlichen Fokussierungsebenen und Abb. 8C stellt das aus vielen solcher Bilder rekonstruierte dreidimensionale Bild dar. Nach 60 Minuten haben einige der Kerne eine kontinuierliche Membranhülle geformt (Abb. 9A, B, C). Wurde die Fusion der Chromatin-gebundenen Membranvesikel bei der Kernbildungsreaktion durch $GTP\gamma S$ verhindert, so ist die Chromatinoberfläche mit kleinen Strukturen bedeckt, die unfusionierte Membranvesikel darstellen und im Querschnitt das Chromatin wie ein feiner Saum umgeben (Abb. 10A, B, C). Wurde die Kernbildungsreaktion ohne Cytosol durchgeführt, so sind Membranvesikel von einigen Mikrometern Durchmesser an das Chromatin gebunden (Abb. 11). Die großen Membranvesikel in Abb. 11 sind wahrscheinlich durch die Fusion der in Abb. 10 zu sehenden kleinen, Chromatin-gebundenen Membranvesikel miteinander entstanden. Die Fusion benötigt demnach keine cytosolischen Faktoren. Ohne

Abb. 7. Die Bildung der Kernhülle nach 10-minütiger Inkubation im vereinfachten Kernbildungssystem

Die Bildung von Zellkernen im vereinfachten Kernbildungssystem wurde mit einer hochauflösenden Kamera verfolgt. Nach 10-minütiger Inkubation wurde ein Aliquot der Reaktion mit einer Färbelösung, die Octadecyl-Rhodamin als hydrophoben, fluoreszierenden Farbstoff enthielt,

vermischt und im Fluoreszenz-Mikroskop analysiert. Bilder eines einzelnen sich bildenden Zellkerns wurden in 0,2µm Schritten senkrecht zur Fokussierungsebene aufgenommen. Zwei solcher Bilder sind in (A) und (B) gezeigt. Aus allen Bildern eines Objektes wurde ein dreidimensional erscheinendes Bild rekonstruiert (C). Weitere Beispiele hierfür sind in (D) und (E) zu sehen. Auf der Oberfläche des Chromatins sind die abgeflachten Chromatin-gebundenen Membranvesikel als kleine Flächen zu erkennen (Pfeile). Maßstab: 10µm.

Abb. 8. Die Bildung der Kernhülle nach 30-minütiger Inkubation im vereinfachten Kernbildungssystem

Die Kernbildung wurde wie in Abb. 7 analysiert. Aus den Bildern eines Objektes (A und B) wurde wiederum ein dreidimensional erscheinendes Bild erhalten (C). Weitere Beispiele sind in (D) und (E) zu sehen. In (A) ist die sich formende Kernhülle als unterbrochenen Linie zu erkennen. Der Pfeil in (C) deutet auf eine noch unbedeckte Stelle der Chromatinoberfläche, der Pfeil in (D) zeigt eine Membran-bedeckte Stelle. Maßstab: 10µm.

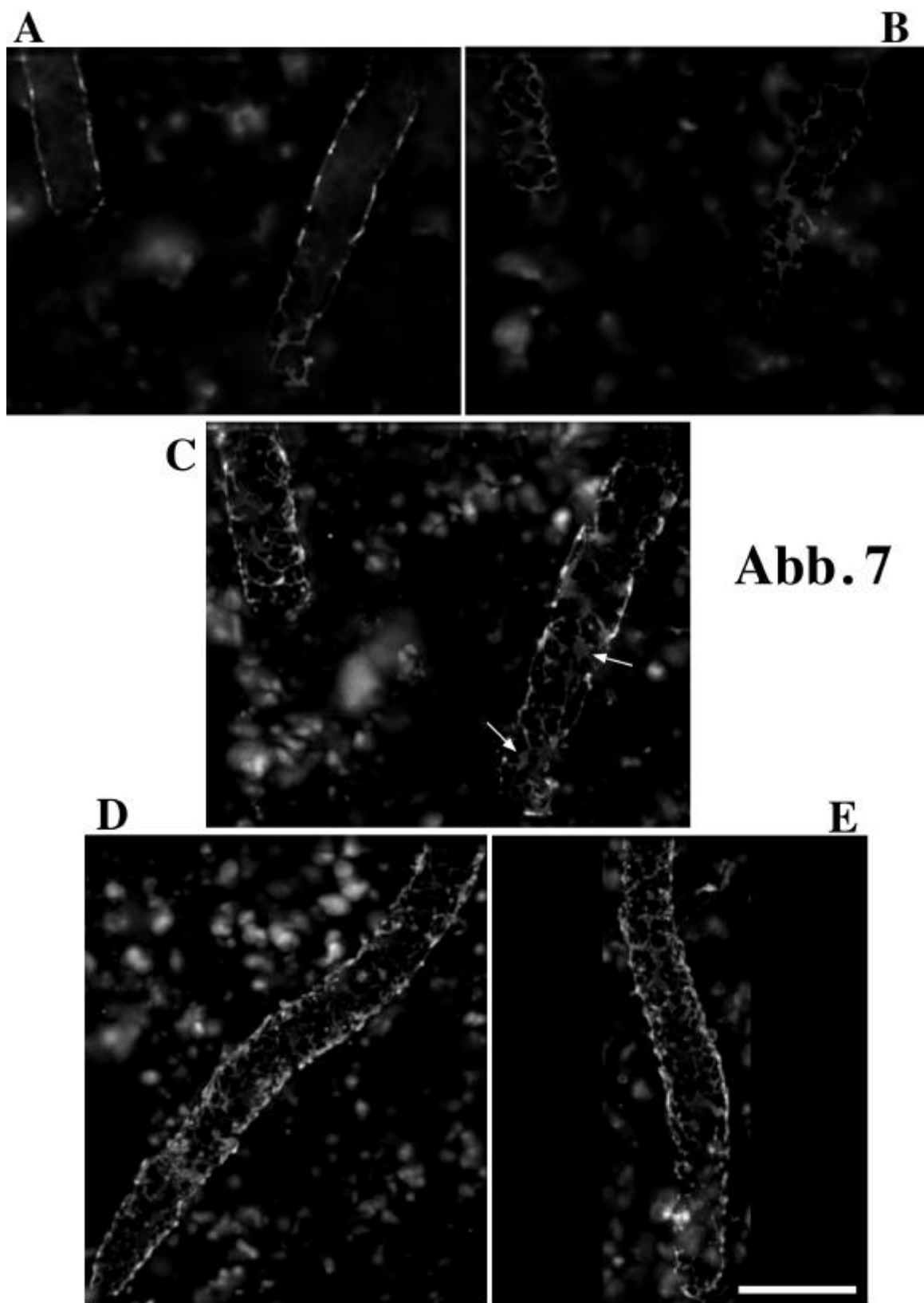
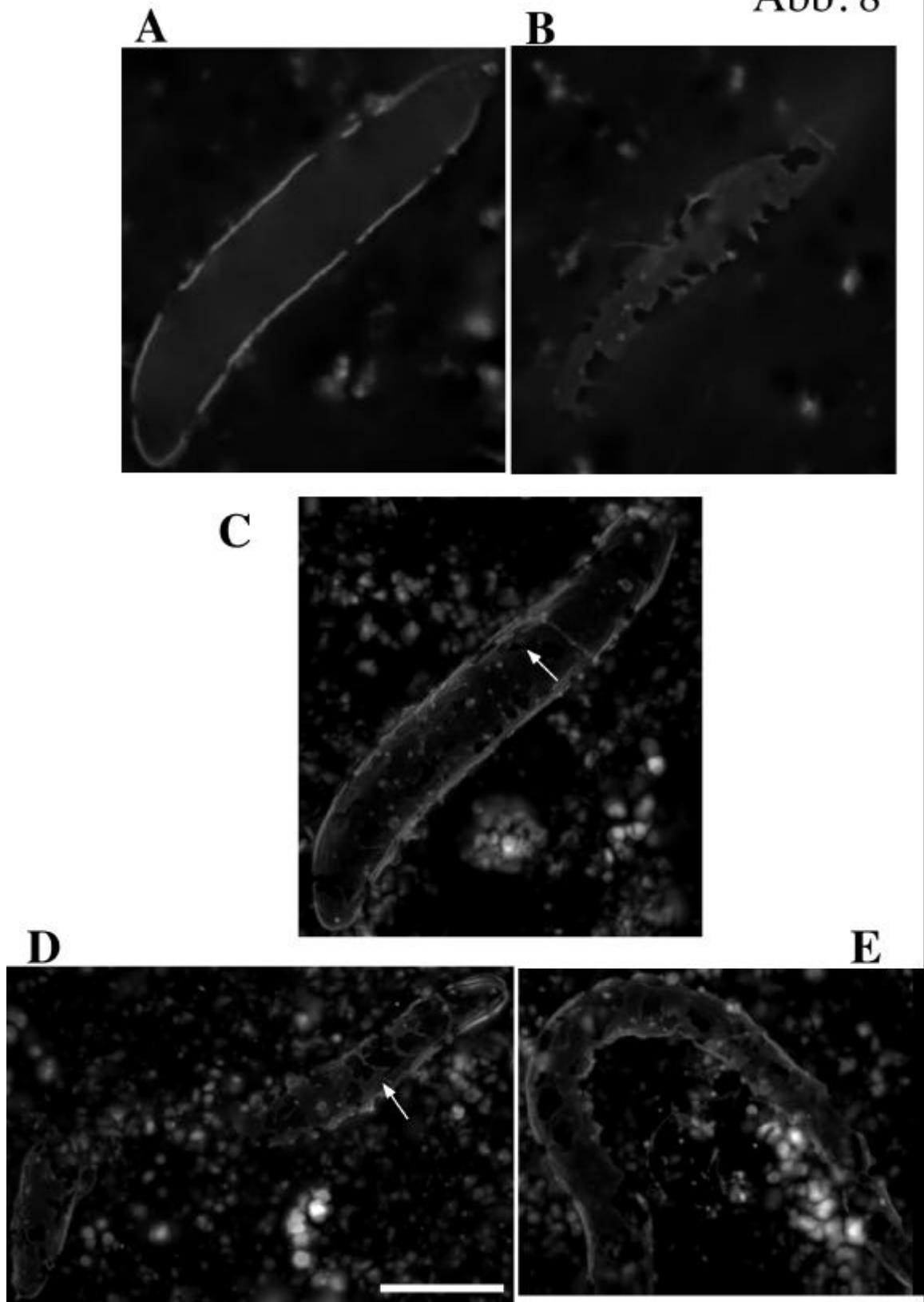


Abb. 8



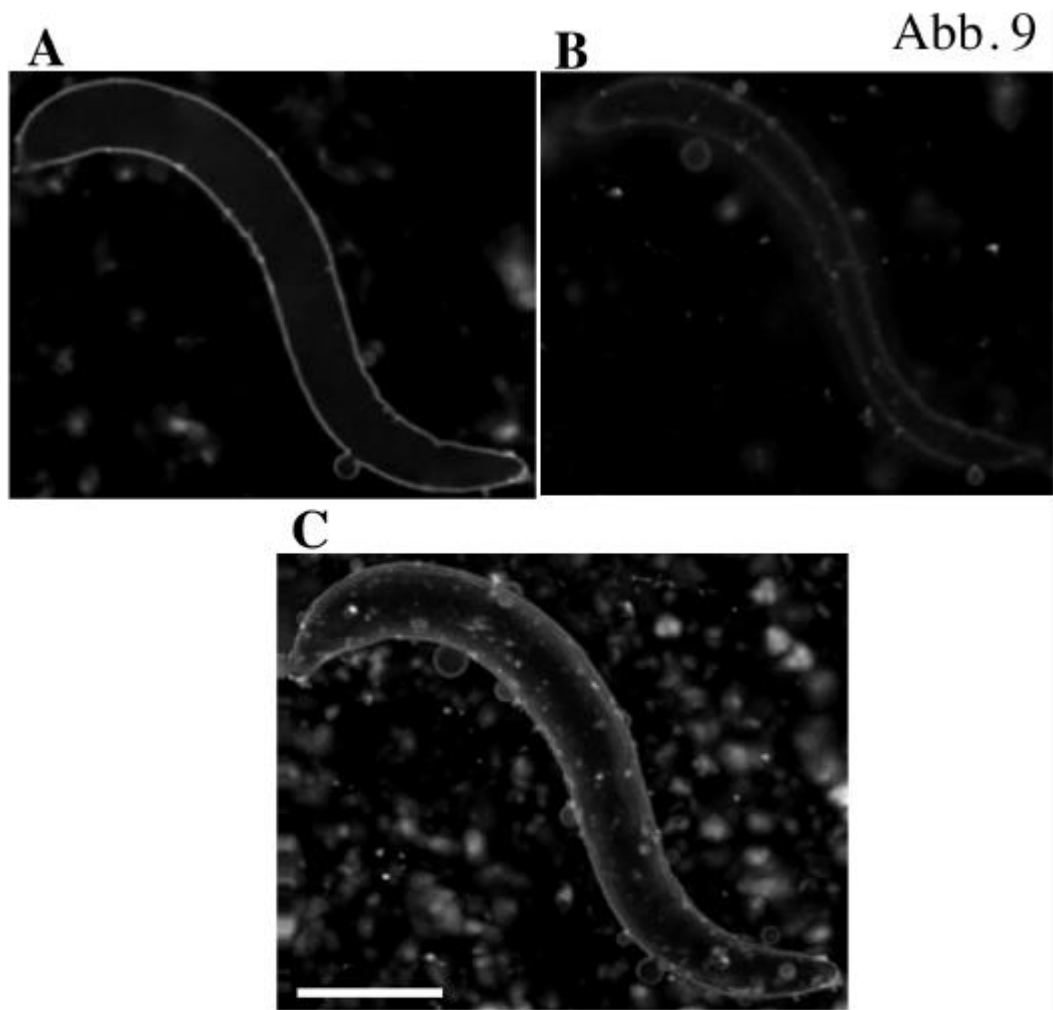


Abb. 9. Nach 60-minütiger Inkubation haben einige Zellkerne eine kontinuierliche Kernhülle geformt

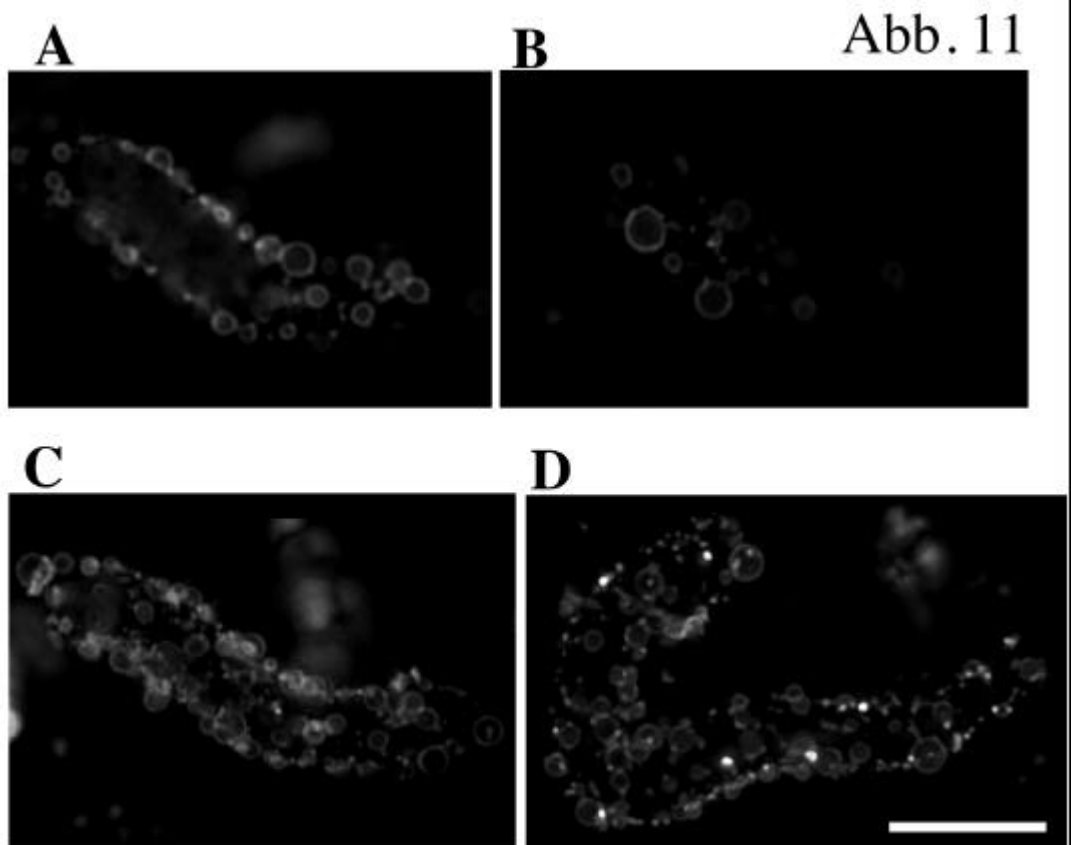
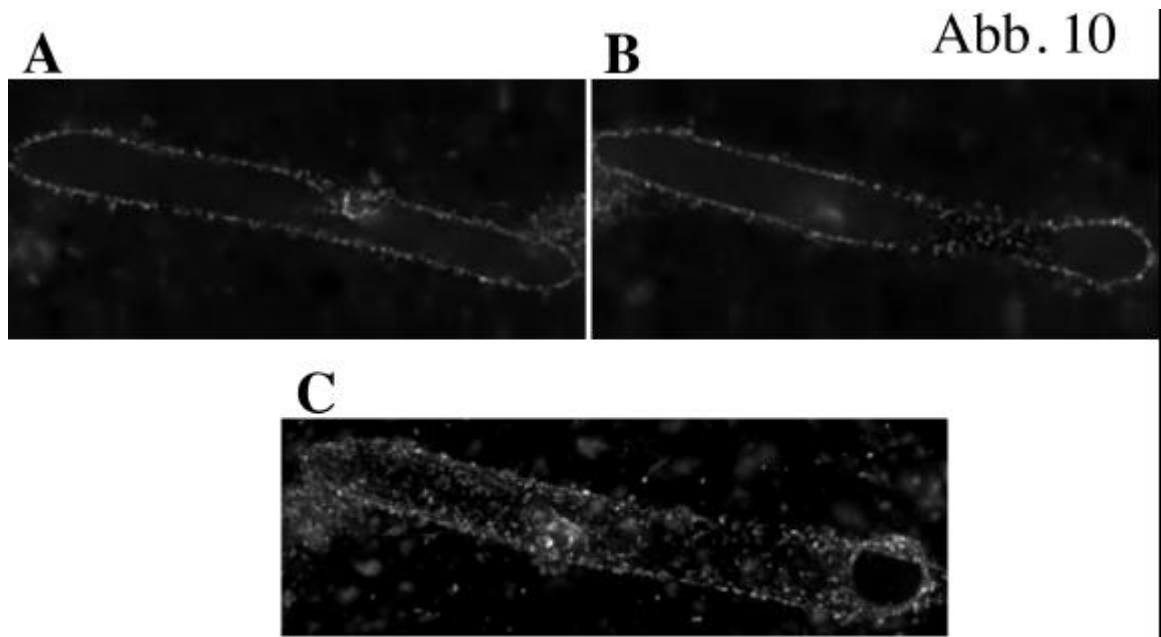
Eine vereinfachte Kernbildungsreaktion wurde wie in Abb. 7 analysiert. Aus den Bildern eines Objektes (A und B) wurde wiederum ein dreidimensional erscheinendes Bild erhalten (C). In (A) ist die kontinuierliche Kernhülle als durchgehende, scharfe Linie zu erkennen. Maßstab: 10µm.

Abb. 10. In Gegenwart von GTPγS sind kleine Membranvesikel an das Chromatin gebunden

Die vereinfachte Kernbildungsreaktion wurde für 60 Minuten in Gegenwart von GTPγS durchgeführt, um die Fusion der Chromatin-gebundenen Membranvesikel zu verhindern, und anschließend wie in Abb. 7 analysiert. Aus den Bildern eines Objektes (A und B) wurde ein dreidimensional erscheinendes Bild erhalten (C). Maßstab: 10µm.

Abb. 11. Ohne Cytosol binden und fusionieren die Membranvesikel miteinander, aber flachen nicht auf der Oberfläche des Chromatins ab

Die vereinfachte Kernbildungsreaktion wurde ohne Cytosol für 30 Minuten durchgeführt und anschließend wie in Abb. 7 analysiert. Aus den Bildern eines Objektes (A und B) wurde ein dreidimensional erscheinendes Bild erhalten (C). Ein weiteres Beispiel ist in (D) zu sehen. Maßstab: 10µm.



Cytosol liegen diese Membranvesikel jedoch nicht flach auf Oberfläche des Chromatins, sondern bleiben kugelförmig. Die großen Chromatin-gebundenen Membranvesikel können keine Kernhülle bilden. Eine Aktivität des Cytosols bewirkt also, daß die miteinander fusionierenden Chromatin-gebundenen Membranvesikel auf der Oberfläche des Chromatins abflachen und in der Folge eine kontinuierliche Hülle um das Chromatin bilden können. Diese neue Aktivität könnte auch für den relativ gleichmäßigen Abstand der inneren und äußeren Kernmembran der Zellkerne verantwortlich sein.

Bei der Bildung der Kernhülle können demzufolge drei Schritte unterschieden werden: 1. Die Bindung von Membranvesikeln an das Chromatin, die weder Energie noch Cytosol benötigt. 2. Die Fusion der Chromatin-gebundenen Membranvesikel, die Energie in Form von ATP und GTP benötigt, jedoch kein Cytosol. 3. Das Abflachen der fusionierenden Membranvesikel, das cytosolische Faktoren benötigt.

3.1.5. Erste Fraktionierung der für das Abflachen der Kernhülle notwendigen cytosolischen Aktivitäten

Für die Fraktionierung der für das Abflachen der Kernhülle notwendigen cytosolischen Faktoren ist es von Vorteil, daß die Fusion der Chromatin-gebundenen Membranvesikel Cytosol-unabhängig ist. Da die an der Fusion beteiligten Proteine nicht vom Cytosol bereitgestellt werden müssen, sollten sie nicht als notwendige Faktoren bei der Fraktionierung auftauchen.

Das Cytosol wurde durch Anionenaustauscher-Chromatographie mit DEAE-Sepharose fraktioniert, indem cytosolische Proteine bei einer Salzkonzentration von 50mM Kaliumacetat gebunden wurden, und anschließend schrittweise mit 150 mM Kaliumacetat (Fraktion D1), 250mM Kaliumacetat (D2) und 500mM Kaliumacetat (D3) eluiert wurden. Die Proteine der Fraktionen wurden durch SDS-PAGE analysiert und in der vereinfachten Kernbildungsreaktion getestet (Abb. 12A, B). Während mit der Durchlauf-Fraktion (DL) und den Fraktionen D2 und D3 große, kugelförmige Membranvesikel am Chromatin

gebunden waren, wie in Abwesenheit von Cytosol, bildete sich mit der Fraktion D1 eine abgeflachte Kernhülle, die als scharfe Linie sichtbar ist. Ein Unterschied zur Kernbildung mit unfraktioniertem Cytosol ist, daß weniger Kerne eine kontinuierliche Membranhülle aufweisen. Dies konnte nicht durch die Zugabe einer der anderen Fraktionen zur D1-Fraktion verändert werden. Möglicherweise liegen die cytosolischen Aktivitäten für das Abflachen der Kernhülle in den DEAE-Fractionen verdünnter vor als im Ausgangs-Cytosol. Natürlich ist es offen, ob die D1-Fraktion eine oder mehrere Aktivitäten enthält. Hierfür sind weitere Fraktionierungsschritte notwendig.

3.2. Bildung des Endoplasmatischen Reticulums *in vitro*

3.2.1. Ein *in vitro* System zur Bildung polygoner Membrannetzwerke

Werden dieselben "leichten" Membranen, die in der Lage sind, Zellkernhüllen zu bilden, mit Cytosol und einem Energie-regenerierenden System für 30 bis 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, so bildet ein Großteil der Membranen dünne Tubuli, die ein ausgedehntes Membrannetzwerk bilden. Die Membrantubuli können durch sehr vorsichtiges Vermischen mit einem fluoreszierenden, hydrophoben Farbstoff im Fluoreszenz-Mikroskop sichtbar gemacht werden (Abb. 13B, rechtes Farbbild). Ein Teil der Membranen formt große, runde Vesikel oder scheint in Aggregaten vorzuliegen.

Die Bildung dieser Membrannetzwerke findet nicht nur mit der Membran- und Cytosolfraktion statt, sondern auch, wenn stattdessen der Eiextrakt mit einem Energie-regenerierenden System inkubiert wird. Die Membrannetzwerke sind jedoch schwer zu sehen, da der Großteil der Membranen des Extraktes keine Membrannetzwerke bildet (Daten nicht gezeigt).

Abb. 12. Fraktionierung der für das Abflachen der Chromatin-gebundenen Membranvesikel notwendigen cytosolischen Aktivität

(A) Cytosol wurde durch Anionenaustauscher-Chromatographie mit einer DEAE-Säule aufgetrennt. Cytosolische Proteine wurden bei 50mM Kaliumacetat gebunden und schrittweise eluiert. Die erhaltenen Fraktionen, DL (Durchlauf), D1 (mit 150mM Kaliumacetat eluiert), D2 (250mM Kaliumacetat), D3 (500mM Kaliumacetat), wurden durch SDS-PAGE und Färben mit "Coomassie Blau" analysiert. Die linke Bahn zeigt die Proteine des Ausgangs-Cytosols. An der rechten Seite sind die Positionen und Molekulargewichte von Markerproteinen (in kDa) angegeben. (B) Die Fraktionen wurden auf ihre Aktivität bei der Bildung einer abgeflachten Kernhülle in einer vereinfachten Kernbildungsreaktion getestet und wie in Abb. 7 analysiert. Die Aktivität befindet sich in der Fraktion D1. Nur mit dieser Fraktion bildet sich eine abgeflachte Kernhülle. Die beiden rechten Bilder der D1 Fraktion stellen zwei unterschiedliche Fokussierungsebenen desselben Objektes dar. Das linke Bild der D1 Fraktion zeigt ein weiteres Beispiel. Mit den anderen Fraktionen sind große Membranvesikel an das Chromatin gebunden, ähnlich wie in Abwesenheit von Cytosol. Maßstab für alle Bilder: 10µm.

A

DEAE-
Fraktionen

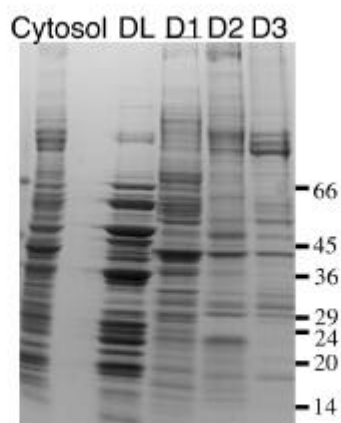
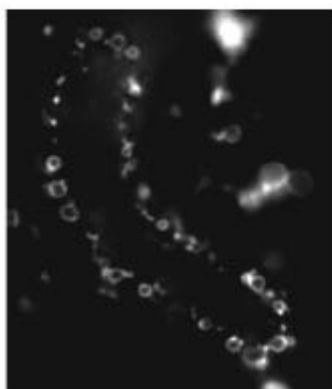


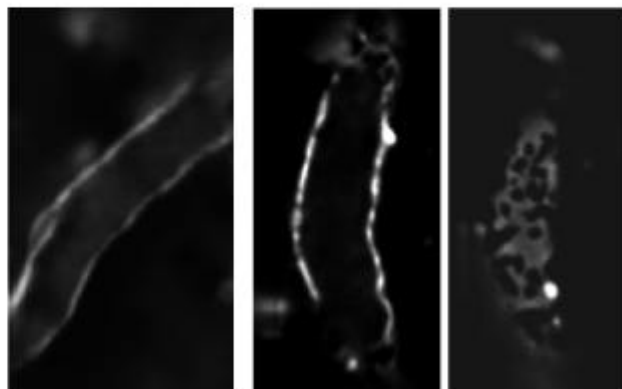
Abb. 12

B

Durchlauf



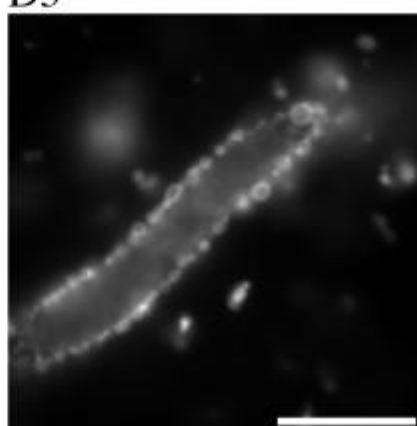
D1



D2



D3



Um die Membrannetzwerke besser sichtbar zu machen, wurde versucht, sie auf der Glasoberfläche eines Objektträgers anhaften zu lassen. In der Tat reicht es aus, einen Reaktionsansatz von 10 µl auf einen Objektträger mit einer leichten Vertiefung mit einem Durchmesser von etwa 1 cm zu pipettieren und 30-60 Minuten bei Raumtemperatur zu inkubieren, um Membrannetzwerke stabil auf der Glasoberfläche gebunden zu erhalten. Ungebundene Membranen und freier fluoreszierender Farbstoff können anschließend leicht gewaschen werden. Die Membranen liegen auf der Glasoberfläche in einer Fokussierungsebene des Fluoreszenz-Mikroskops und sind weniger beweglich als in Lösung. Insgesamt wurden so klare Bilder von ausgedehnten, polygonalen Membrannetzwerken, sowohl mit dem Extrakt als auch mit den leichten Membranen und dem Cytosol, erhalten (Abb. 13A, B; Schwarz-Weiß-Bilder der linken Spalte). Im folgenden wird zu einem Experiment oft sowohl ein Gesamtbild der Membranen, das einfach durch vorsichtiges Mischen einer ER-Bildungsreaktion mit dem fluoreszierenden Farbstoff erhalten wird (Farbbilder), als auch ein Bild von Membrannetzwerken, die auf der Glasoberfläche eines Objektträgers anhaften, gezeigt (Schwarz-Weiß-Bilder).

Die Membrantubuli sind gradlinig und haben eine Länge von einigen Mikrometern bevor sie einen Knotenpunkt erreichen, an dem 3 oder selten 4 Membrantubuli zusammentreffen (Abb. 13A). Die Membrantubuli sind meist nicht über ihre ganze Länge an die Glasoberfläche gebunden, sondern nur an einzelnen Punkten, zwischen denen die Membrantubuli kleine Bewegungen ausführen können. Die auf der Glasoberfläche anhaftenden Netzwerke sind nach dem Waschen im Puffer für 5-15 Minuten stabil. Danach zerfallen die Membrantubuli in Vesikel (nicht gezeigt). Dies könnte darauf hindeuten, daß die Membrantubuli nicht der energetisch günstigste Zustand für die Membranen sind, der sich spontan bilden könnte und danach stabil sein sollte. Im Fluoreszenz-Mikroskop haben

Abb. 13. *In vitro* Bildung der polygonalen Membrannetzwerke

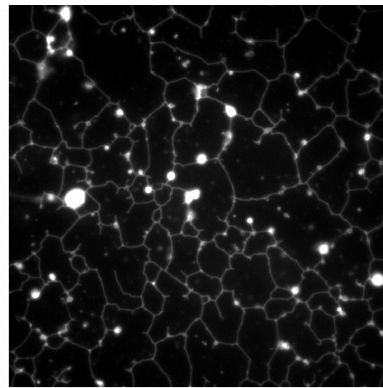
Membrannetzwerke wurden in dem Eiextrakt (A) oder mit den leichten Membranen und Cytosol (B) für 30 Minuten bei Raumtemperatur gebildet und nach Anfärben mit einem hydrophoben, fluoreszierenden Farbstoff im Fluoreszenzmikroskop beobachtet. In (C) wurde das Cytosol durch Puffer ersetzt. In (D) wurde die Reaktion mit Membranen und Cytosol auf Eis durchgeführt.

Reaktionen, die auf einem Objektträger durchgeführt wurden, so daß die Membrannetzwerke auf der Glasoberfläche haften und ungebundene Membranen gewaschen werden können, sind als Schwarz-Weiß Bilder dargestellt (linke Spalte). Dies gilt auch für alle folgenden Abbildungen. Bei den farbigen Bildern der rechten Spalte, wie auch bei allen Farbbildern in den folgenden Abbildungen, wurde die ER-Bildungsreaktion in einem Reaktionsgefäß durchgeführt und anschließend ein Aliquot der Reaktion mit der Färbelösung gemischt. Diese Bilder zeigen somit ein Gesamtbild der ER-Bildungsreaktion. Maßstab: Schwarz-Weiß Bilder 10µm; Farbbilder 80µm.

Abb. 13

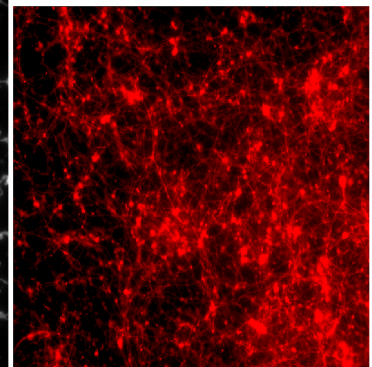
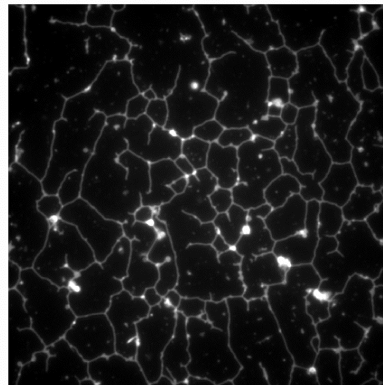
A

Eiextrakt



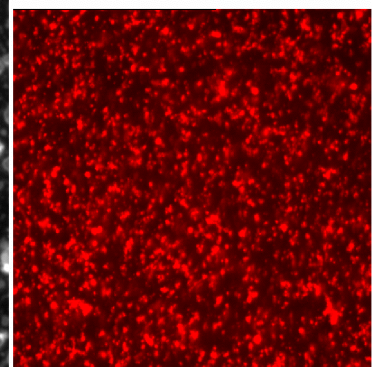
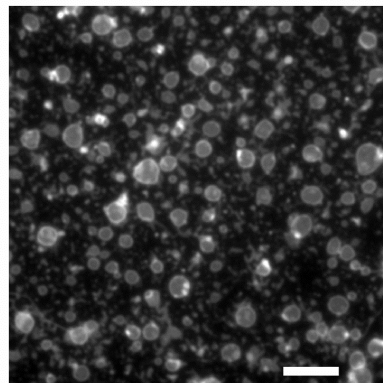
B

Membranen
+
Cytosol



C

Membranen
+
Puffer



D

4°C

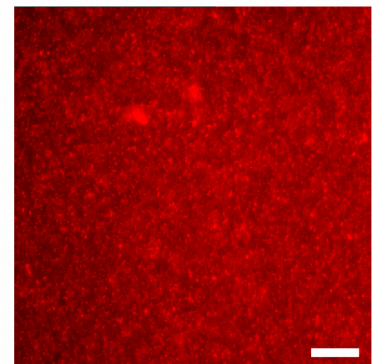


Abb. 14

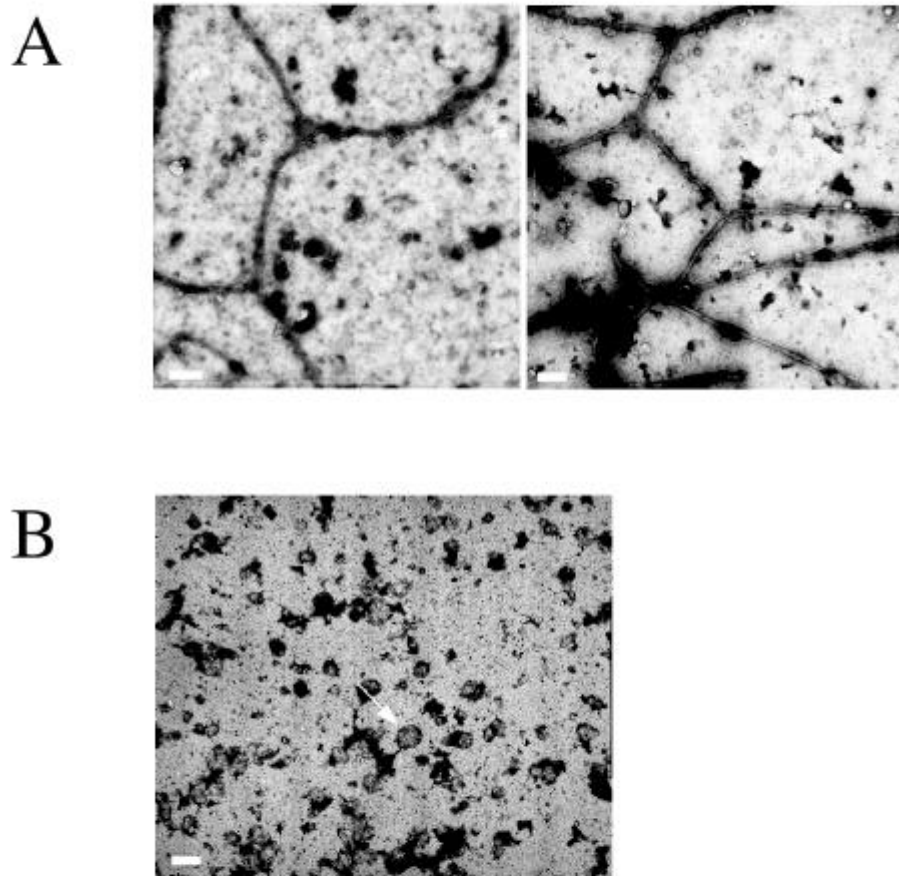


Abb. 14. Elektronenmikroskopische Analyse der Membrannetzwerke

(A) Membrannetzwerke wurden aus den leichten Membranen und Cytosol auf der Oberfläche eines Trägers für die Elektronenmikroskopie gebildet und nach Fixieren und Negativkontrastierung im Elektronenmikroskop analysiert. Die Membrantubuli haben einen Durchmesser von etwa 100nm. In (B) wurde das Cytosol durch Puffer ersetzt. Daher bilden sich keine Membrantubuli, sondern große Membranvesikel (Pfeil). Maßstab: (A) 500nm; (B) 1µm.

die Membrantubuli einen Durchmesser, der kleiner oder gleich der kleinsten, auflösbaren Länge von etwa 200nm ist.

Um ein genaueres Bild der Membrannetzwerke zu erhalten, wurden sie im Elektronenmikroskop analysiert. Hierfür wurden die Membrannetzwerke auf Trägern für die Elektronenmikroskopie gebildet und nach Fixierung mit Glutaraldehyd durch Negativkontrastierung mit Uranylacetat sichtbar gemacht. Unter diesen Bedingungen werden verzweigte Membrantubuli erhalten, die im elektronenmikroskopischen Bild einen Durchmesser von etwa 100nm haben (Abb. 14A).

3.2.2. ER-Membranen sind Bestandteil der polygonen Membrannetzwerke

Die in diesem System gebildeten polygonen Membrannetzwerke haben eine verblüffende Ähnlichkeit mit den Membranstrukturen des peripheren ER in Zellen (vergleiche zum Beispiel Abb. 13A mit Abb. 1A). Aus den Untersuchungen zur Kernbildung ist außerdem bekannt, daß die leichten Membranen Proteine des ER enthalten (siehe Abb. 4A).

Um zu prüfen, ob die Netzwerke aus Membranen des ER gebildet sind, wurden die Membrannetzwerke wie üblich auf der Glasoberfläche eines Objektträgers gebildet, dann mit Glutaraldehyd fixiert, und in der Immunfluoreszenz mit einem Antikörper gegen das ER-Markerprotein TRAP α analysiert (Abb. 15A). Tatsächlich sind so dieselben polygonen Membrannetzwerke sichtbar, wie durch einfaches Anfärben der Membranen mit dem hydrophoben Fluoreszenzfarbstoff. Der Antikörper gegen TRAP α markiert die Netzwerke spezifisch, da in Gegenwart des Peptids, gegen das der Antikörper gerichtet ist, keine Netzwerke sichtbar sind (Abb. 15A). Dies bedeutet, daß ein Teil der Membranen im Netzwerk aus ER-Membranen gebildet wird. Durch die Fixierungsprozedur sind die Membrannetzwerke nicht so gut erhalten, wie bei der sofortigen Betrachtung im Fluoreszenz-Mikroskop (vergleiche z.B. Abb. 15A mit 13B, linkes Bild).

Viele Proteine des ER besitzen Oligosaccharid-Seitenketten, an die das Lectin Concanavalin A (ConA) gut bindet, während viele Proteine des Golgi-Apparates Oligosaccharid-Seitenketten besitzen, die von dem Lectin "Wheat germ agglutinin" (WGA) erkannt werden. Dementsprechend markieren diese mit fluoreszierenden Gruppen modifizierten Lectine in fixierten und permeabilisierten Zellkulturzellen das ER beziehungsweise den Golgi-Apparat (Daten nicht gezeigt). Beide Lectine, modifiziert mit unterschiedlichen fluoreszierenden Gruppen, wurden zu den fixierten und permeabilisierten Membrannetzwerken gegeben und im Fluoreszenz-Mikroskop analysiert (Abb. 15B). Mit ConA zeigen sich dieselben Membrannetzwerke, die mit dem hydrophoben Fluoreszenzfarbstoff zu sehen sind, während mit WGA die Membranstrukturen praktisch nicht markiert werden.

Die Membrannetzwerke wurden außerdem mit einem monoklonalen Antikörper, Mab 414, getestet, der mehrere Kernporenproteine erkennt (Meier et al., 1995). Diese Kernporenproteine liegen im Eiextrakt in der cytosolischen Fraktion vor und werden bei der Assemblierung der Kernpore aus dem Cytosol rekrutiert. In vielen Eizellen und sich schnell teilenden Zellen liegen Kernporen in besonderen Strukturen vor, den sogenannten "Annulate Lamellae" (Kessel, 1992). "Annulate Lamellae" sind im Cytosol vorliegende Stapel abgeflachter Membranen der Kernhülle mit Kernporen, jedoch ohne eine Kernlamina. Sie stellen möglicherweise eine Speicherform für Komponenten der Kernhülle dar. Obwohl dieser Antikörper sehr klar die Kernhülle von im *Xenopus*-System gebildeten Zellkernen markiert (Abb. 15C, Einfügung im rechten Bild), reagiert er nicht mit Proteinen der Membrannetzwerke (Abb. 15C). Diese besitzen also keine Kernporen.

Die in diesem *in vitro* System assemblierten Membrannetzwerke bestehen aus Membranen des ER, und nicht oder nur zu einem geringen Anteil aus Membranen des Golgi-Apparates. Es wird daher angenommen, daß die Bildung der Membrannetzwerke in diesem *in vitro* System die Bildung des ER in eukaryontischen Zellen widerspiegelt.

Abb.15. ER-Membranen sind Bestandteil der Membrannetzwerke

Die Membrannetzwerke wurden wie üblich auf einem Objektträger gebildet, anschließend fixiert und mit verschiedenen Antikörpern oder Lectinen markiert.

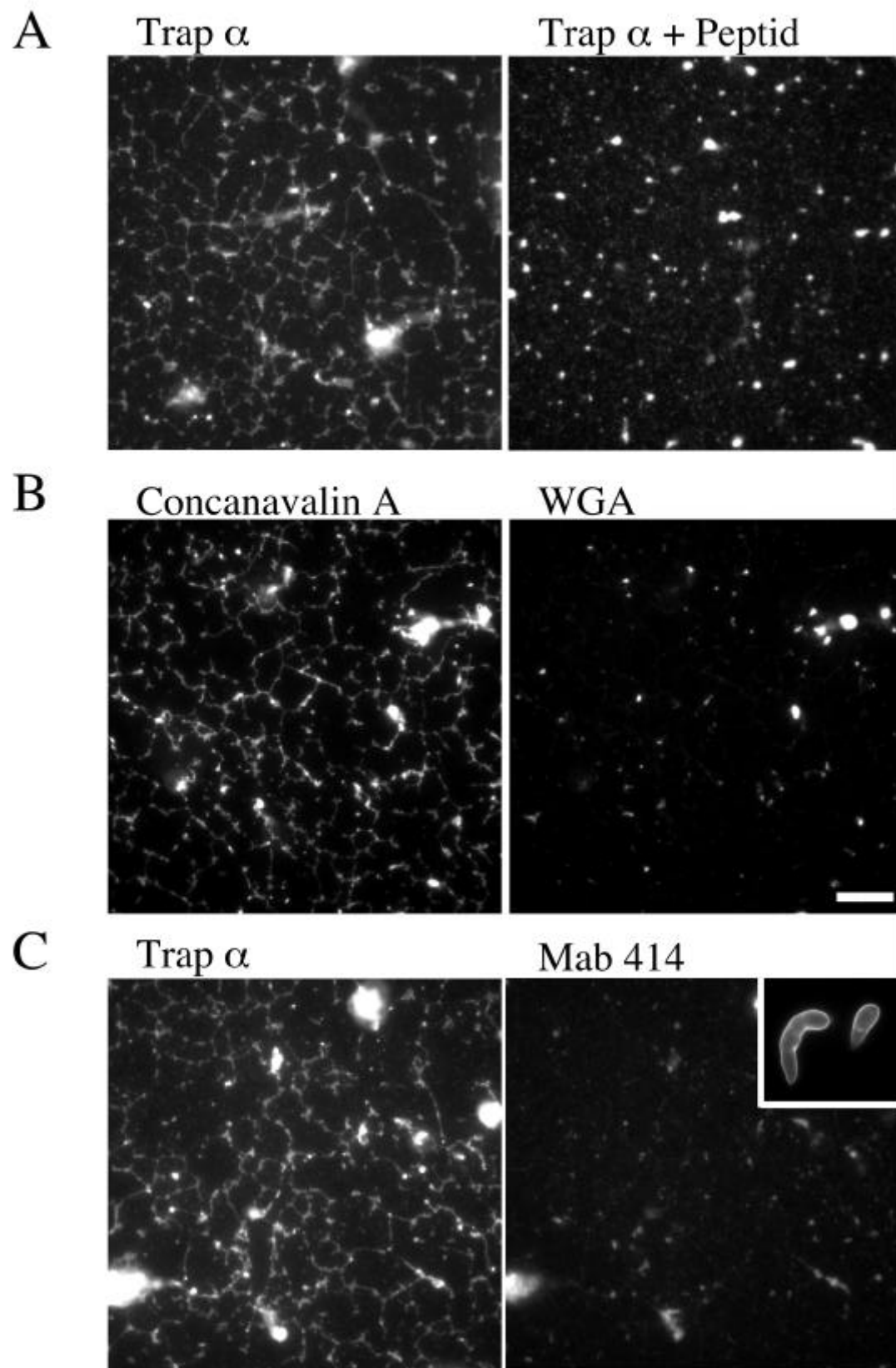
(A) Antikörper gegen des ER-Markerprotein TRAP α markieren spezifisch die Membrannetzwerke, da diese nicht markiert sind, wenn die Immunfluoreszenz in Gegenwart des Peptides, gegen das der Antikörper gerichtet ist, durchgeführt wurden.

(B) Die Membrannetzwerke wurden gleichzeitig mit dem Rhodamin-markierten Lectin Concanavalin A (ConA) und "Oregon-Grün"-markiertem "Wheat germ agglutinin" (WGA) inkubiert, um ER-Membranen (ConA) und Golgi-Membranen (WGA) zu detektieren. Die beiden Bilder zeigen denselben Bildausschnitt.

(C) Die Membrannetzwerke wurden mit einem Antikörpern gegen Kernporenproteine (Mab 414) inkubiert, um Kernporen und "Annulate Lamellae" zu detektieren (rechtes Bild). Gleichzeitig wurden die Membrannetzwerke mit einem Antikörper gegen das ER-Markerprotein TRAP α markiert (linkes Bild). Die beiden Bilder zeigen denselben Bildausschnitt. Das kleine, eingefügte Bild zeigt in einer Positivkontrolle, daß Mab 414 die Kernhülle von Zellkernen, die im *Xenopus* System gebildet wurden, deutlich markiert.

Maßstab für alle Bilder (außer dem eingefügten Bild in C): 10 μ m.

Abb. 15



3.2.3. Charakterisierung der ER-Bildung *in vitro*

Zu Beginn der Reaktion liegen die Membranen als homogene Vesikelpopulation mit einem durchschnittlichen Durchmesser von etwa 100nm bis 200nm vor (Abb. 4B). Wie können aus diesen kleinen Membranvesikeln ausgedehnte, polygone Membrannetzwerke entstehen? In jedem Fall müssen die Membranvesikel miteinander fusionieren. Daher sollten Bedingungen, die die Fusion der Membranvesikel verhindern, auch die Bildung der Membrannetzwerke verhindern.

Die ER-Bildung ist Cytosol-, Temperatur- und Energie-abhängig. Bei Inkubation der ER-Bildungsreaktion auf Eis liegen die Membranen, genauso wie am Beginn der Reaktion, in Form kleiner Vesikel vor, die im Fluoreszenz-Mikroskop nach Anfärben als homogene Fläche erscheinen (Abb. 13 D).

Wird das Cytosol durch Puffer ersetzt, so bilden sich keine Membrannetzwerke, sondern sehr große, meist kugelförmige Membranvesikel mit Durchmessern von mehreren Mikrometern (Abb. 13C und 14B). Die großen Membranvesikel müssen durch die Fusion der kleinen Membranvesikel miteinander entstehen. Dies bedeutet, daß alle Proteine, die für die Fusion der Membranvesikel notwendig sind, sich zumindest zum Teil in der leichten Membranfraktion befinden. In Übereinstimmung damit ist auch die bereits erwähnte homotypische Fusion von ER-Vesikeln aus *S.cerevisiae* in einem *in vitro* System unabhängig von Cytosol. Das überraschende Ergebnis ist, daß die Fusion der kleinen Membranvesikel allein nicht ausreicht, um die Membrantubuli zu bilden. Vielmehr wird dazu eine Aktivität aus dem Cytosol benötigt. Wird Cytosol nach der Bildung der großen Membranvesikel zu der Reaktion gegeben, so bilden diese keine Membrannetzwerke mehr (Daten nicht gezeigt). Das Cytosol muß also während der Fusion der Membranvesikel anwesend sein, damit sich die Membrantubuli und Membrannetzwerke bilden können.

Die ER-Bildung wird verhindert, wenn ATP in dem Reaktionsansatz durch die Zugabe von Hexokinase und Glukose in ADP und Glukose 6-Phosphat umgesetzt wird (Abb.16A). Ohne ATP werden auch keine großen Membranvesikel gebildet. Dies ist in

Übereinstimmung mit der ATP-Abhängigkeit anderer zellulärer Membran-Fusionsreaktionen. Eine Kontrollreaktion nur mit Hexokinase hat keinen Einfluß auf die ER-Bildung (Abb. 16B).

Abb. 16

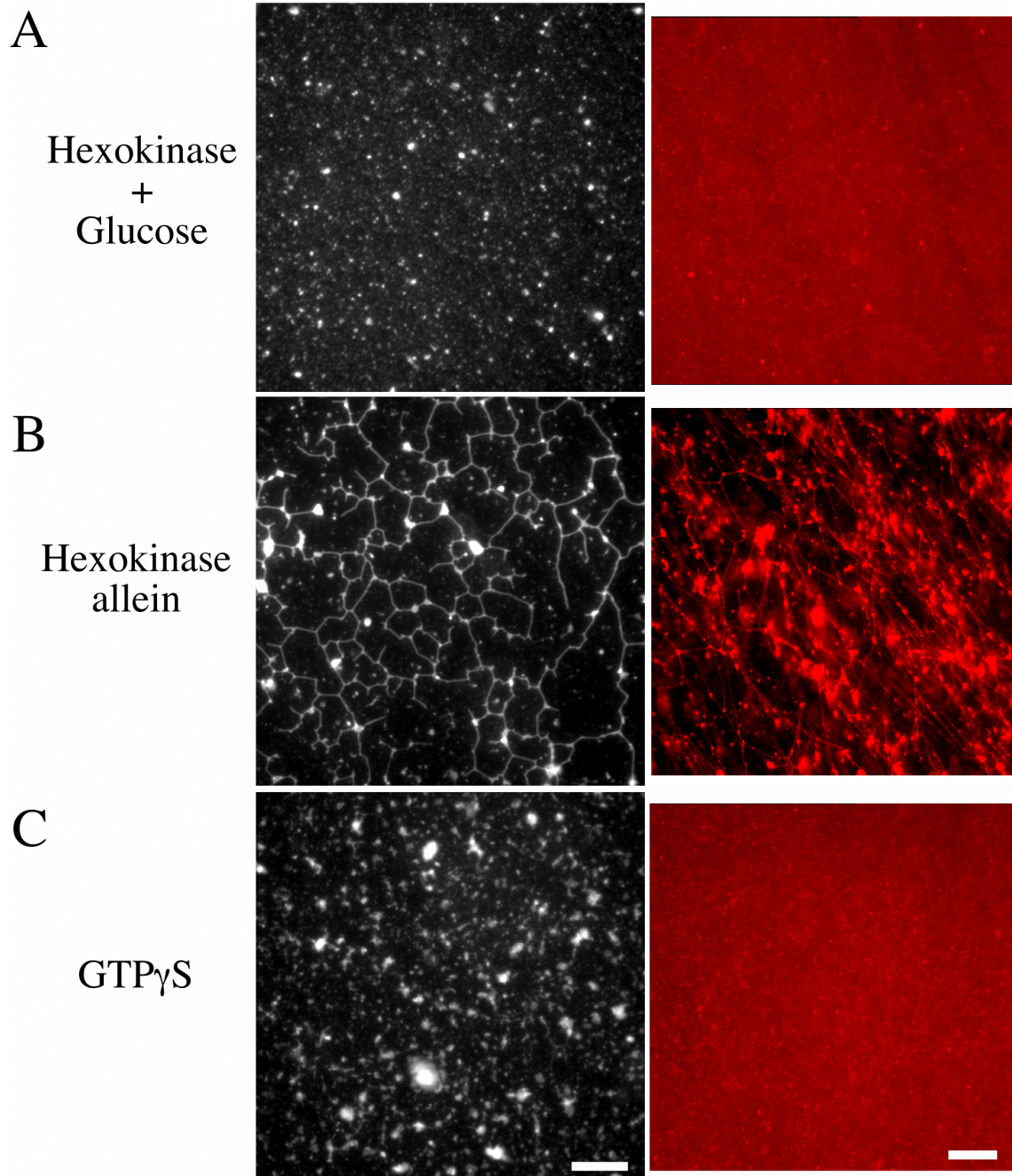


Abb. 16. Die Bildung der Membrannetzwerke benötigt ATP und ist durch GTP γ S hemmbar

In (A) wurde ATP durch die Zugabe von Hexokinase und Glukose zu einer ER-Bildungsreaktion depletiert. (B) zeigt eine Kontrollreaktion mit Hexokinase allein. In (C) wurde 1mM GTP γ S zu Beginn der Reaktion zugegeben. Die Bildung der Membrannetzwerke wurde wie in Abb. 13 beobachtet und dargestellt. Maßstab: Schwarz-Weiß Bilder 10 μ m; Farbbilder 80 μ m.

Von GTP γ S ist bekannt, daß es Membranfusionen, zum Beispiel beim Vesikeltransport entlang des sekretorischen Transportweges und bei der Zellkernbildung in dem *Xenopus in vitro* System, verhindert. Abb. 16C zeigt, daß GTP γ S auch die Bildung der Membrannetzwerke verhindert. Da auch keine großen Membranvesikel entstehen, verhindert GTP γ S die Fusion der kleinen Membranvesikel und damit auch die Netzworkebildung.

Werden die leichten Membranen mit NEM behandelt, bilden sie keine Netzwerke und keine großen Membranvesikel (Abb. 17B). Dies kann dadurch erklärt werden, daß NEM ein NSF-ähnliches Protein der Membran inaktiviert, das für die Fusion der Membranvesikel und somit für die ER-Bildung notwendig ist. Die NEM-Behandlung des Cytosols verhindert die Netzworkebildung nicht (Abb. 17A).

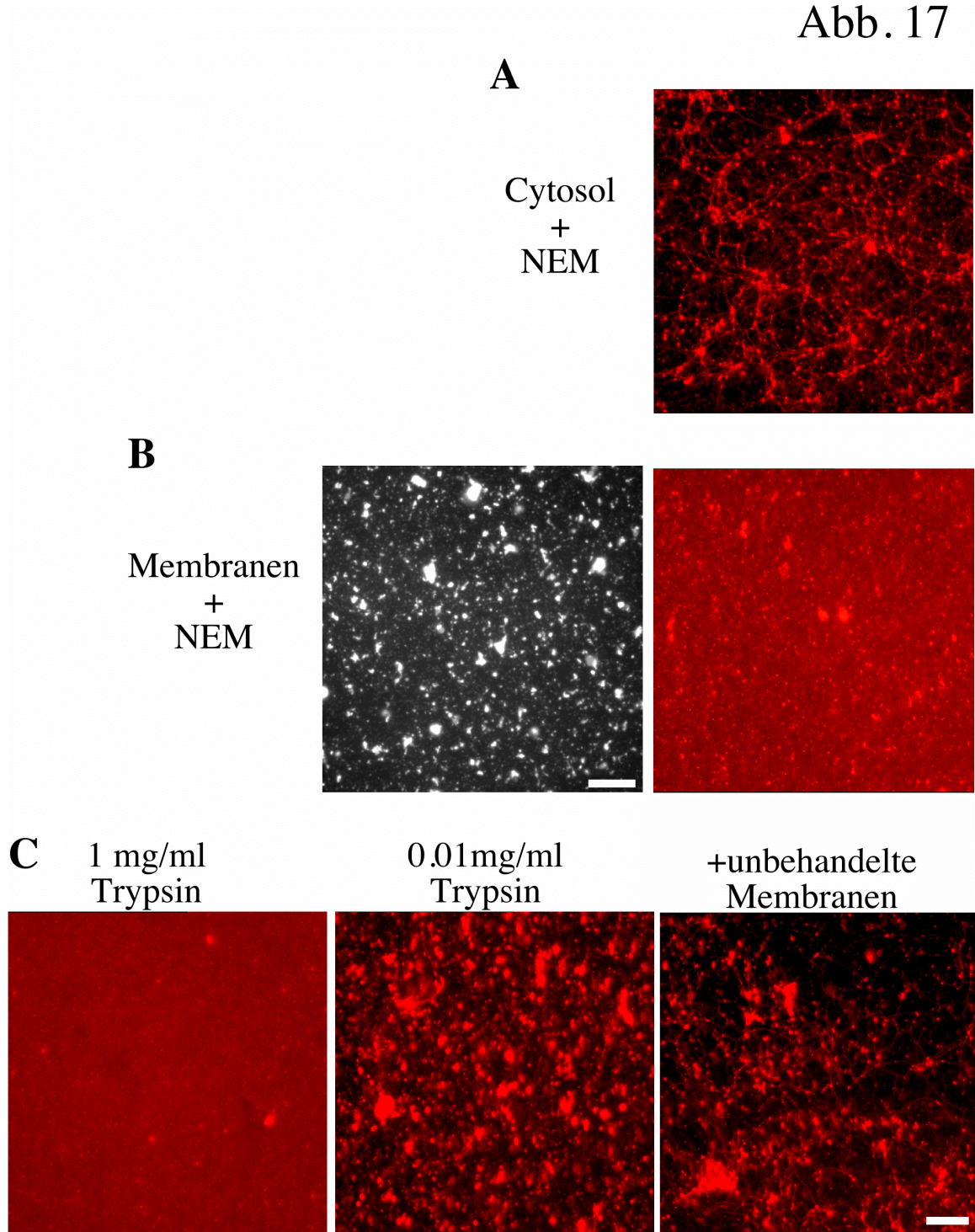
Werden die Membranen mit Trypsin behandelt und nach Entfernen des Trypsins in der ER-Bildungsreaktion eingesetzt, so bilden sich keine Netzwerke. Stattdessen sind bei geringer Trypsin-Konzentration Membranaggregate zu sehen und bei hoher Konzentration erscheinen die Membranvesikel nach der Inkubation als homogen gefärbte Fläche wie zu Beginn der Reaktion (Abb. 17C). Eine Protease-sensitive Komponente der Membran ist also für die Fusion der Membranvesikel und der Bildung der Membrannetzwerke notwendig.

Zwei Vorgänge können somit bei der ER-Bildung unterschieden werden. Zum einen fusionieren die kleinen Membranvesikel miteinander in einer Reaktion, die ATP und GTP benötigt und an der NEM- und Protease-sensitive Komponenten der Membran beteiligt sind. Zum anderen ist eine cytosolische Aktivität dafür verantwortlich, daß durch die Fusion nicht einfach größere, kugelförmige Membranvesikel entstehen, sondern dünne Membrantubuli, die polygone Membrannetzwerke bilden.

Abb. 17. Die Bildung der Membrannetzwerke ist durch die Behandlung der Membranen mit NEM oder Trypsin hemmbar

Das Cytosol (A) oder die leichten Membranen (B) wurden mit NEM behandelt und nach Inaktivierung von NEM durch DTT in der ER-Bildungsreaktion getestet.
(C) Die Membranen wurden mit zwei verschiedenen Mengen Trypsin behandelt und nach Inaktivierung der Protease zusammen mit Cytosol in der ER-Bildungsreaktion getestet. Zur Kontrolle der Inaktivierung der Protease wurde zu einer Reaktion mit Membranen, die mit 0.01mg/ml Trypsin behandelt waren, die gleiche Menge unbehandelte Membranen gegeben (C, rechtes Bild). Maßstab: Schwarz-Weiß Bild 10µm; Farbbilder 80µm.

Abb. 17



3.2.4. Ca^{2+} verhindert die ER-Bildung *in vitro*

Werden Zellkulturzellen mit einem Calcium-Ionophor in Gegenwart von 1mM CaCl_2 im Zellkulturmedium behandelt, so fragmentiert das ER in Vesikel (Koch et al., 1988; Subramanian und Meyer, 1997). Daher wurde der Einfluß von Ca^{2+} auf die Netzwerkbildung in dem in dieser Arbeit etablierten *in vitro* System getestet. Wird CaCl_2 in einer Konzentration von 1 mM zur Reaktion gegeben, so wird die Bildung der Membrannetzwerke stark gehemmt. Stattdessen bilden sich große Membranvesikel und Membranaggregate (Abb. 18A). Eine Calcium-Konzentration von 0.1mM Ca^{2+} hat bereits keine erkennbare Wirkung mehr (Daten nicht gezeigt). Wird Ca^{2+} nach der Bildung der Membrannetzwerke vorsichtig zugegeben, so vergrößern die dünnen Membrantubuli ihren Durchmesser deutlich (Abb. 18B). Eine Fragmentierung, wie sie *in vivo* beobachtet wird, ist nicht zu erkennen.

3.2.5. ER-Bildung unter mitotischen Bedingungen

Das ER fragmentiert in der Mitose zu einem unterschiedlichem Ausmaß, je nachdem welches Gewebe oder welche Zelllinien in Zellkultur untersucht werden (siehe Einleitung). Einerseits kann die Fragmentierung zur kompletten Deassemblierung des ER führen, andererseits kann das ER in der Mitose als Netzwerk intakt bleiben. Warum es diese gewebe- und zellspezifischen Unterschiede gibt, ist unbekannt. Im folgenden wurde daher die ER-Bildung *in vitro* unter mitotischen Bedingungen untersucht. Das *Xenopus in vitro*

Abb. 18. Ca^{2+} hemmt die ER-Bildung. Die Zubabe von Ca^{2+} zu bereits gebildeten Membrannetzwerken führt zu einer Vergrößerung des Durchmessers der Membrantubuli, ähnlich wie die nachträgliche Zugabe von Proteinase K

(A) CaCl_2 wurde zu Beginn der Reaktion in einer Konzentration von 1mM zugegeben und die ER-Bildung auf dem Objektträger (Schwarz-Weiß Bild) oder in einem Reaktionsgefäß durchgeführt (Farbbild).

(B) Nach der Bildung der Membrannetzwerke in einem Reaktionsgefäß wurde 1µl der Reaktion zu 2µl einer Färbelösung gegeben, die 2mM CaCl_2 enthielt (linkes Bild). In der Kontrolle wurde

dieselbe Reaktion mit einer Färbelösung ohne CaCl_2 gefärbt (rechtes Bild). Die Pfeile zeigen auf Membrantubuli mit großem Durchmesser.

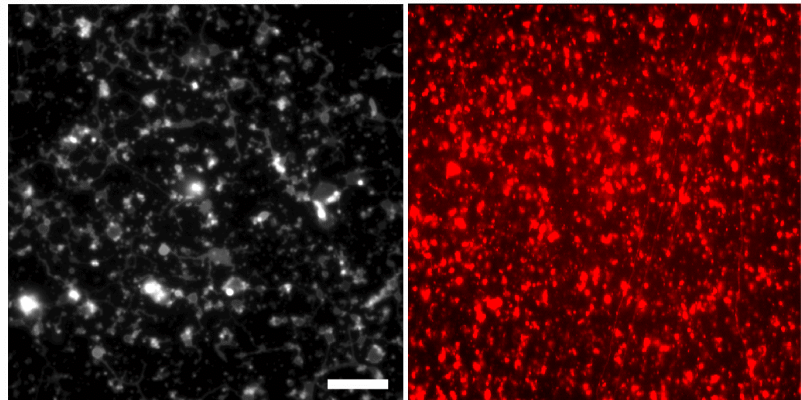
(C) Nach der Bildung der Membrannetzwerke wurde 1 μl der Reaktion zu 2 μl einer Färbelösung gegeben, die 1.5mg/ml Proteinase K enthielt (linkes Bild). Pfeile zeigen auf Membrantubuli mit großem Durchmesser. Im rechten Bild wurde die Proteinase K zuvor mit 2mM PMSF inaktiviert. Die Bilder in (B) und (C) wurden etwa 15 Minuten nach der Zugabe der Färbelösung aufgenommen.

Maßstab: Schwarz-Weiß Bild 10 μm ; Farbbilder 80 μm .

Abb. 18

A

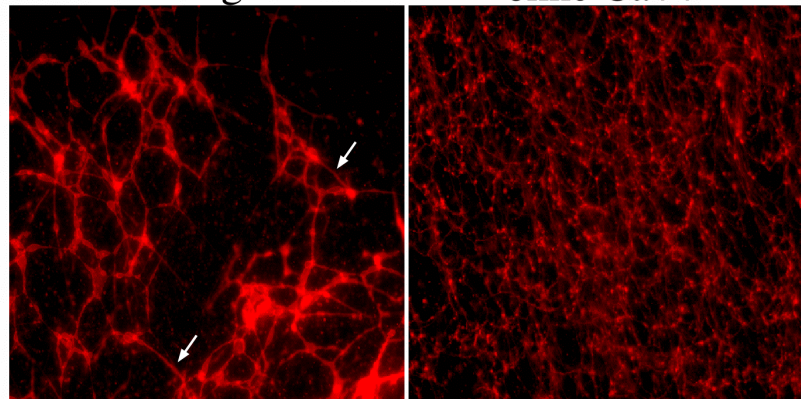
Ca⁺⁺



B

Ca⁺⁺
nachträglich

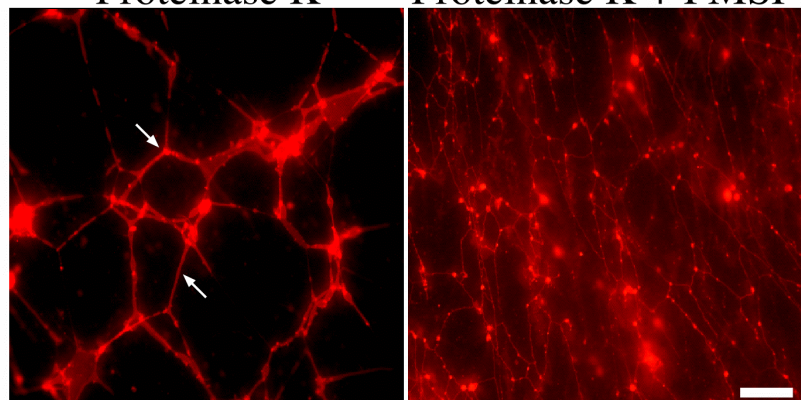
Kontrolle
ohne Ca⁺⁺



C

Proteinase K

Proteinase K + PMSF



System erlaubt eine einfache Manipulation des Zellzyklus-Stadiums des Extraktes. Zwei verschiedene Arten mitotischer Extrakte und der hieraus hergestellten mitotischen Cytosole und Membranen wurden verwendet. Durch die Zugabe von Cyclin B zu einem Eiextrakt, der sich in der Interphase befindet, geht der Extrakt in einen mitotischen Zustand über. Bei der zweiten Methode wird genau genommen ein Extrakt in einem meiotischen Zustand erhalten. Dieser meiotische Zustand zeigt viele Eigenschaften eines mitotischen Zustandes und wurde in zahlreichen Untersuchungen mit diesem gleichgesetzt (Pfaller et. al., 1991; Shamu und Murray, 1992). Vor der Befruchtung befindet sich das Ei in der Metaphase der Meiose II. Werden beim Aufschluß der Eier keine besonderen Vorkehrungen getroffen, so erhält man einen Eiextrakt, der vom meiotischen Zustand in den Interphasen-Zustand übergegangen ist. Der meiotische Zustand kann jedoch bei der Präparation des Eiextraktes erhalten werden, wenn der Aufschluß in einem Puffer mit Phosphataseinhibitoren und EGTA zum Chelatieren von Calciumionen erfolgt. Bei beiden Herstellungsmethoden kann der Eiextrakt in Membranen und Cytosol getrennt werden.

Zunächst wurde der mit Cyclin B hergestellte mitotische Extrakt in dem *in vitro* System zur ER-Bildung getestet. Dazu wurde Cyclin B zu einem Eiextrakt gegeben und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Diese Zeit ist ausreichend, um den Extrakt in einen mitotischen Zustand zu überführen. Der mitotische Zustand kann einfach durch den Anstieg in der Histon H1-Kinaseaktivität des Extraktes gemessen werden. Die Histon H1-Kinaseaktivität kann wiederum überwiegend auf die Aktivierung der CDC2/Cyclin B-Kinase zurückgeführt werden. Daraufhin wurden bereits gebildete Membrannetzwerke durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren zerstört (Daten nicht gezeigt) und die Reaktion wie üblich auf einem Objektträger durchgeführt. Die Abb. 19A zeigt, daß sich unter diesen

Abb. 19. Die ER-Bildung ist in einem mit Cyclin B hergestellten mitotischen Extrakt verringert

(A) Ein mitotischer Extrakt wurde durch Inkubation von Interphasen-Extrakt mit Cyclin B hergestellt und anschließend wie in Abb. 13 in der ER-Bildungsreaktion getestet.

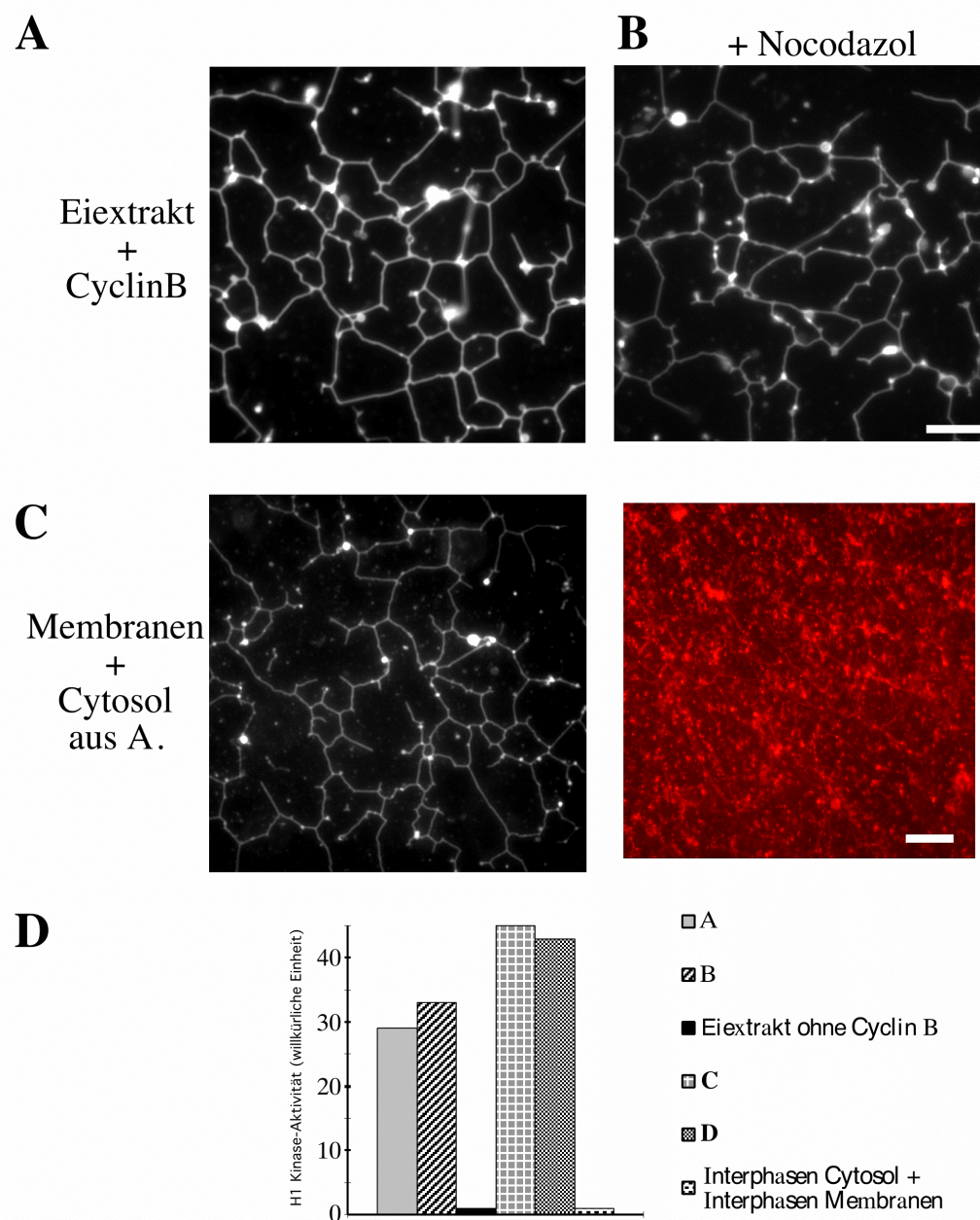
(B) Zu dem mitotischen Extrakt aus (A) wurde zusätzlich der Mikrotubuli-Hemmstoff Nocodazol (0.2mg/ml) gegeben.

(C und D) Aus dem mitotischen Extrakt wurde durch Zentrifugation eine leichte Membranfraktion und Cytosol hergestellt, die wie in Abb. 13 in der ER-Bildungsreaktion getestet wurden.

(E) Der mitotische Zustand des Extraktes sowie der Membranen und des Cytosols daraus wurde durch die Bestimmung der Histon H1-Kinaseaktivität des Reaktionsansatzes am Ende der ER-Bildungsreaktion kontrolliert. Die Buchstaben korrespondieren mit den in (A) bis (D) gezeigten Bildern. In dem gezeigten Experiment nahm die Histon H1-Kinaseaktivität durch die Cyclin B-Behandlung 30 bis 40-fach zu.

Maßstab: Schwarz-Weiß Bilder 10µm; Farbbild 80µm.

Abb. 19



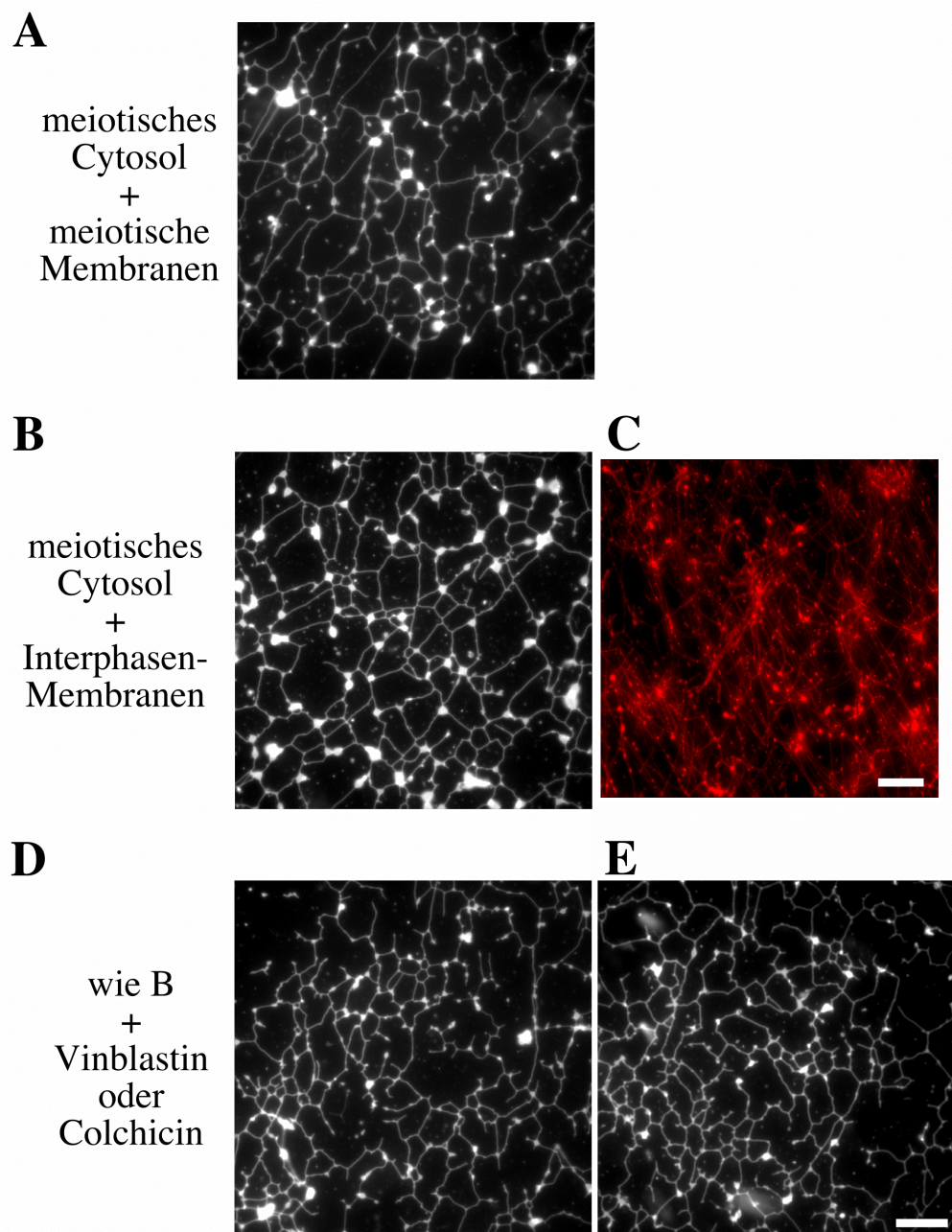
Bedingungen Membrannetzwerke bilden. Während jedoch beim Interphasen-Extrakt meist 50-100% der Fläche des Objektträgers mit den Netzwerken bedeckt waren, waren dies in dem mitotischen Extrakt meist weniger als 5-10% der Fläche (Daten nicht gezeigt). Außerdem waren die unter diesen Bedingungen gebildeten Membrannetzwerke überwiegend grobmaschiger als die mit Interphasen-Eiextrakt gebildeten Netzwerke. Obwohl also Membrannetzwerke in dem mitotischen Extrakt gebildet werden, ist ihre Bildung deutlich verringert gegenüber einem Interphasen-Eiextrakt. Das Cytosol und die leichte Membranfraktion, die aus dem mitotischen Eiextrakt durch Zentrifugation hergestellt wurden, verhielten sich ähnlich (Abb. 19C, D). Im Gesamtbild einer ER-Bildungsreaktion mit mitotischen Membranen und Cytosol ist die geringe Bildung von Membrantubuli mit mitotischem Cytosol und Membranen gut zu erkennen (Abb. 19D, vergleiche zum Beispiel mit Abb. 13B, rechtes Bild).

Der mitotische Zustand des Extraktes wurde zum Zeitpunkt der Beobachtung der Membrannetzwerke durch die Bestimmung der Histon H1-Kinaseaktivität des Ansatzes kontrolliert (Abb. 19E). Die Histon H1-Kinaseaktivität lag 30 bis 40-fach über der Aktivität des Interphasen-Extraktes, vergleichbar mit veröffentlichten Ergebnissen (Murray, 1991). Dies ist eine deutlich höhere Stimulation der Histon H1-Kinaseaktivität, als die 10-15fache Stimulation, die unter physiologischeren Bedingungen in der Mitose beobachtet wird (Shamu und Murray, 1992). In Kontrollexperimenten mit diesem mitotischen Extrakt wurde gezeigt, daß er im Gegensatz zu demselben Extrakt ohne Cyclin B keine Zellkerne zu bilden vermag (Abb. 21A, B).

Als nächstes wurden Cytosol und Membranen aus einem Extrakt verwendet, dessen meiotischer Zustand bei der Präparation aufrechterhalten wurde. Überraschenderweise wurden in diesem Fall ausgedehnte Membrannetzwerke wie in einem Interphasen-Zustand gebildet (Abb. 20A). Die Histon H1-Kinaseaktivität war 13 bis 20-fach so hoch wie in Membranen und Cytosol in der Interphase (Abb. 20F). Dieses meiotische Cytosol wurde auch zusammen mit Interphasen-Membranen verwendet. Es ist bekannt, daß der meiotische Zustand des Cytosols dabei dominant ist, und die Interphasen-Membranen durch Phosphorylierungsreaktionen in meiotische Membranen umgewandelt werden

(Pfaller et al., 1991; Vigers und Lohka, 1992). Nach 30-minütiger Inkubation des meiotischen Cytosols mit Interphasen-Membranen wurden etwaige gebildete Membrannetzwerke durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren zerstört und anschließend wie üblich die ER-Bildungsreaktion auf dem Objektträger durchgeführt. Auch in diesem Fall formten sich ausgedehnte Membrannetzwerke, die nicht von den im Interphasen-Cytosol gebildeten zu

Abb. 20



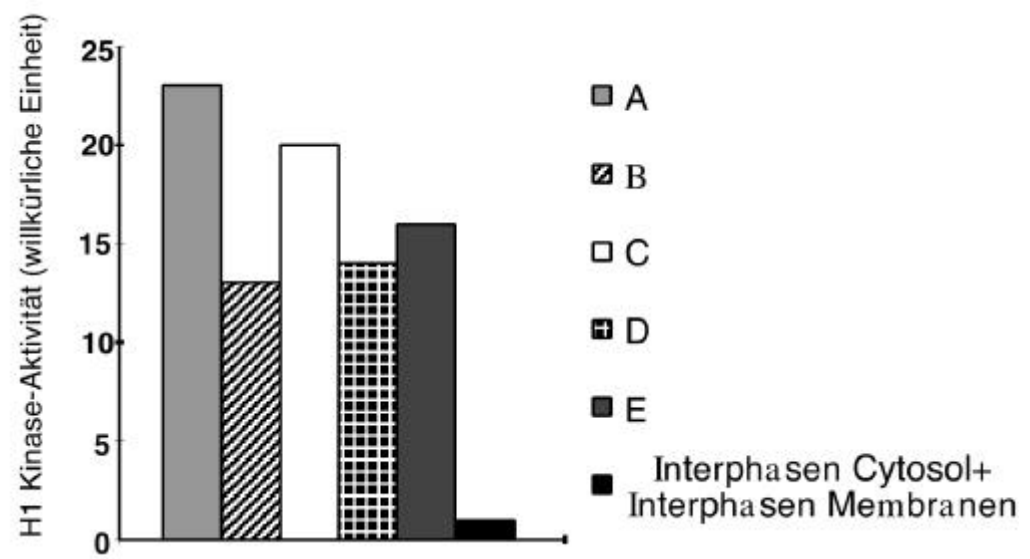
F

Abb. 20. Die Bildung der Membrannetzwerke mit meiotischem Cytosol und Membranen

(A) Meiotische Membranen und meiotisches Cytosol wurden wie im Methodenteil beschrieben hergestellt und wie in Abb. 13 in der ER-Bildungsreaktion getestet.

(B und C) Meiotisches Cytosol wurde mit Interphasen Membranen für 30 Minuten inkubiert, um die Membranen in einen meiotischen Zustand zu überführen. Anschließend wurden sie wie in Abb. 13 in der ER-Bildungsreaktion getestet.

(D und E) Zu einer ER-Bildungsreaktion wie in (B) wurde zu Beginn Vinblastin (200µM, D) oder Colchicin (100µM, E) gegeben.

(F) Der meiotische Zustand der ER-Bildungsreaktionen wurde am Ende der Reaktion durch die Bestimmung der Histon H1-Kinaseaktivität des Reaktionsansatzes kontrolliert. Die Histon H1-Kinaseaktivität lag 10 bis 20-fach über Werten von Interphasen-Cytosol.

Maßstab: Schwarz-Weiß Bilder 10µm; Farbbild 80µm.

unterscheiden waren (Abb. 20B). Das Gesamtbild der ER-Bildungsreaktion zeigt ebenfalls keinen Unterschied (Abb. 20C). Die Histon H1-Kinaseaktivität war wiederum hoch (Abb. 20F) und in Kontrollexperimenten wurden keine Zellkerne mit dem meiotischen Cytosol gebildet (Abb. 21C).

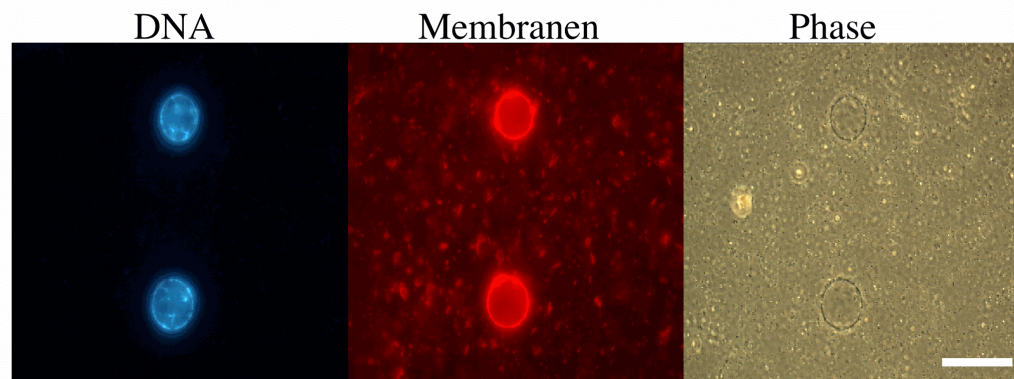
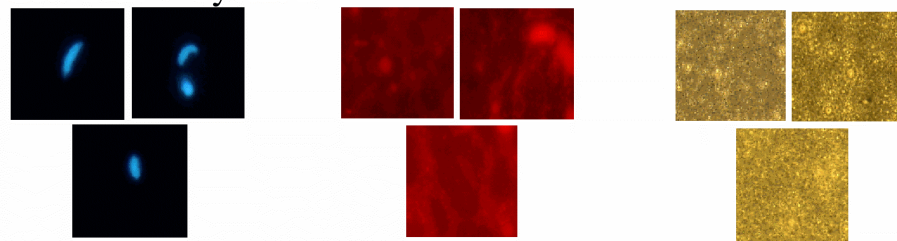
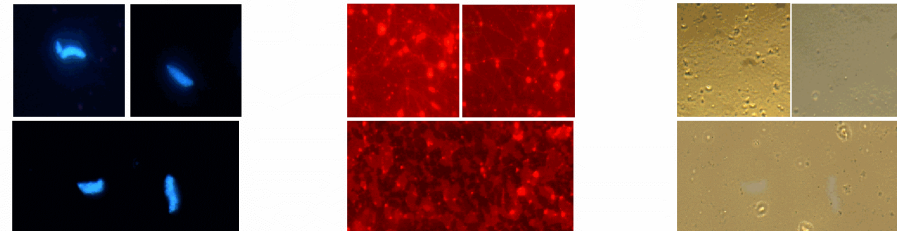
Beide mitotischen/meiotischen Extrakte sind also zur ER-Bildung in der Lage, unterscheiden sich jedoch sehr in dem Ausmaß der ER-Bildung (vergleiche auch Abb. 19D mit Abb. 20C). Dagegen bilden beide Extrakte keine Zellkerne (Abb. 21).

Abb. 21. Sowohl der mitotische Extrakt als auch das meiotische Cytosol und Interphasen-Membranen bilden keine Zellkerne

(A) Interphasen-Extrakt bildet zusammen mit Spermien-Chromatin große Zellkerne. Die DNA (linke Spalte) und die Membranen (mittlere Spalte) wurden wie in Abb. 3 gefärbt. In der rechten Spalte ist ein Phasenkontrastbild gezeigt.

(B und C) Sowohl der in Abb. 19 verwendete mitotische Extrakt als auch das in Abb. 20 verwendete meiotische Cytosol mit Interphasen Membranen bilden zusammen mit Spermien-Chromatin keine Zellkerne. Es binden auch keine Membranvesikel an das Chromatin (vergleiche mit der Bindungsreaktion Abb. 3A). Maßstab für alle Bilder: 30µm.

Abb. 21

A Eiextrakt**B** Eiextrakt + Cyclin B**C** meiotisches Cytosol + Interphasen Membranen

3.2.6. Die *in vitro* Bildung des ER ist unabhängig von Mikrotubuli und Actin-Filamenten

Es ist leicht vorstellbar, wie Cytoskelettstrukturen an der Bildung der Membrannetzwerke beteiligt sein können. Im Falle der Mikrotubuli könnten Mikrotubuli-abhängige Motoren an die ER-Membran binden und beim Bewegen entlang der Mikrotubuli die Membrantubuli mit sich ziehen. Entsprechendes ist für Actin-Filamente denkbar. Einige permanente Kontaktpunkte zwischen dem Membrannetzwerk des ER und dem Cytoskelett könnten das einmal gebildete Netzwerk in der Zelle stabilisieren. In Übereinstimmung mit diesem Modell der ER-Bildung wurde in Zellkulturzellen und *in vitro* gezeigt, daß das ER mit den Mikrotubuli in Kontakt steht, Membrantubuli sich entlang von Mikrotubuli bewegen können und die Bildung und Aufrechterhaltung der netzwerkartigen Struktur des ER Mikrotubuli benötigt (Dabora und Sheetz, 1988; Allen und Vale, 1994; Steffen et al., 1997; Lee et al., 1989). Im folgenden wurde untersucht, ob die ER-Bildung in dem von uns entwickelten *in vitro* System sensitiv gegenüber Reagenzien ist, die Cytoskelettstrukturen wie Mikrotubuli oder Actin-Filamente zerstören.

Bei der Herstellung des Extraktes wird bereits Cytochalasin B zum Extrakt gegeben, um die Bildung von Actin-Filamenten zu verhindern (siehe Material und Methoden). Zusätzlich wurde Latrunculin A, ein Reagenz, das ebenfalls die Bildung von Actinfilamenten hemmt, in verschiedenen Konzentrationen zu der ER-Bildungsreaktion gegeben. Selbst bei den höchsten eingesetzten Konzentrationen von Latrunculin A, die weit über den in der Literatur als ausreichend angegebenen Konzentrationen lagen (Ayscough et al., 1997; Müsch et al., 1997), wurden keine Veränderungen bei der ER-Bildung festgestellt (Abb. 22). Actin-Filamente spielen somit bei der ER-Bildung in diesem System keine Rolle.

Als nächstes versuchten wir, Mikrotubuli und ER-Membranen gleichzeitig sichtbar zu machen, um festzustellen, ob beide in Kontakt miteinander stehen. Dazu wurde Tubulin, das mit fluoreszierendem Rhodamin markiert war, zu einer ER-Bildungsreaktion auf dem Objektträger gegeben. Das Fluoreszenz-markierte Tubulin wird in Zellen wie

unmodifiziertes Tubulin in Mikrotubuli eingebaut. Dadurch werden die Mikrotubuli im Fluoreszenz-Mikroskop sichtbar (Belmont et al., 1990). Mikrotubuli wurden in unserem *in vitro* System nur beobachtet, wenn Taxol, ein Reagenz, das Mikrotubuli stabilisiert, mit in die Reaktion und den Waschpuffer gegeben wurde. Unter diesen Bedingungen wurden kurze Mikrotubuli mit einer Länge von 2-5µm gebildet, die zum Teil genau entlang der Membrantubuli laufen (Abb.23, Pfeile). Besonders dort, wo Mikrotubuli und

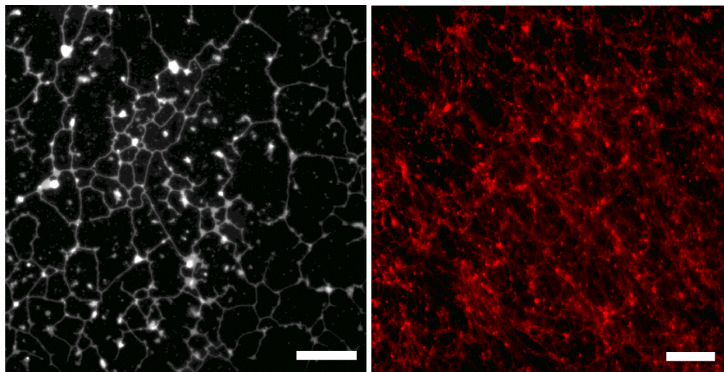


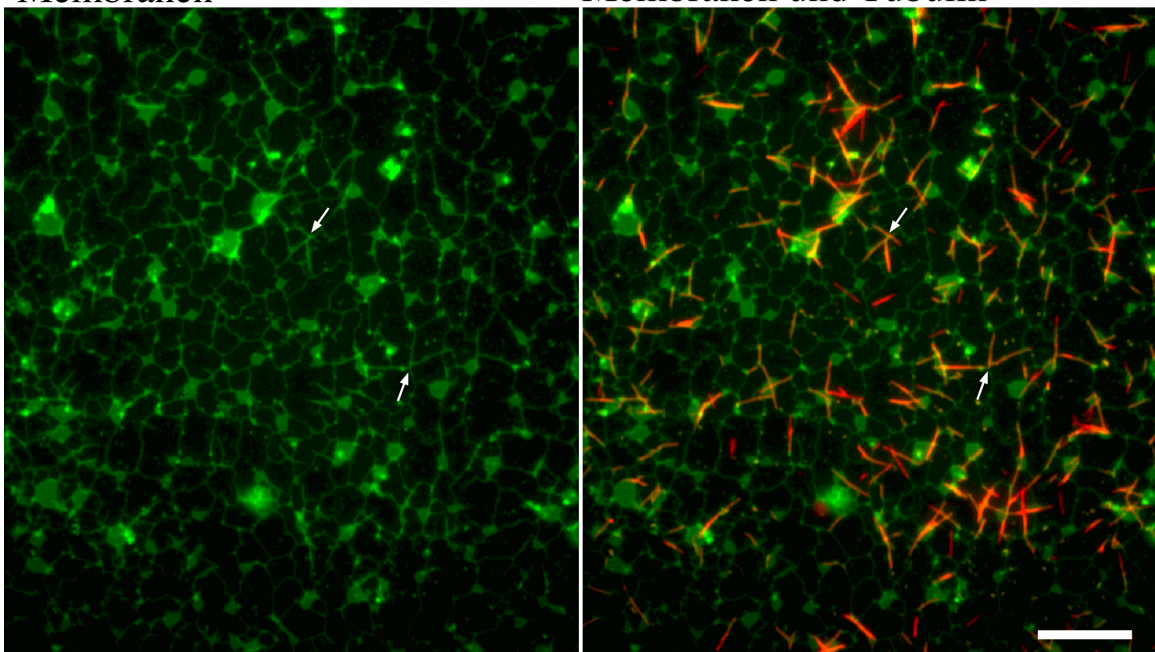
Abb. 22

Latrunculin A

Abb. 23

Membranen

Membranen und Tubulin

**Abb. 22.** Die ER-Bildung ist unabhängig von Actin-Filamenten

Latrunculin A, ein Reagenz, das die Polymerisation von Actin-Filamenten hemmt, wurde in einer Konzentration von 200 μM zur ER-Bildungsreaktion gegeben. Die ER-Bildung wird hierdurch nicht gehemmt. Die Analyse und Darstellung der ER-Bildung erfolgte wie in Abb. 13 beschrieben. Maßstab: Schwarz-Weiß Bild 10 μm ; Farbbild 80 μm .

Abb. 23. Mikrotubuli und Membrantubuli des ER stehen miteinander in Kontakt

Membrannetzwerke wurden in Gegenwart von Taxol und Rhodamin-markiertem Tubulin auf der Oberfläche eines Objektträgers gebildet und danach wie üblich analysiert. Das linke Bild zeigt nur die Membrannetzwerke, das rechte Bild zeigt die Membrannetzwerke (grün) desselben Bildausschnittes zusammen mit den Mikrotubuli (rot). Die Pfeile markieren gleiche Stellen in beiden Bildern, an denen Membrantubuli und Mikrotubuli über Knotenpunkte hinweg zusammen laufen. Maßstab: 10 μm .

Membrantubuli über einen Knotenpunkt hinaus zusammen laufen, scheint es wahrscheinlich, daß sie in Kontakt miteinander stehen. Die meisten Membrantubuli hatten jedoch keine Mikrotubuli in ihrer Nähe und viele Mikrotubuli sind nicht in Kontakt mit den Membrantubuli.

Drei verschiedene Reagenzien, die die Bildung von Mikrotubuli verhindern, wurden auf ihre Wirkung bei der ER-Bildung getestet. Weder Nocodazol, noch Colchicin oder Vinblastin hatten einen erkennbaren Einfluß auf die Netzbildung, obwohl sie in bis zu fünfmal höheren Konzentrationen, als in der Literatur als ausreichend angegeben, eingesetzt wurden (Dabora und Sheetz, 1988; Lee et al., 1989; Allan und Vale, 1991). Dies war der Fall unabhängig davon, ob Eiextrakt (Abb. 24A), Membranen und Cytosol (Abb. 24B, C) oder auch mitotischer Extrakt oder meiotisches Cytosol mit Interphasen-Membranen (Abb. 19B, 20D, E) verwendet wurden. Die Netzbildung war sowohl auf der Glasoberfläche des Objektträgers als auch in Lösung zu beobachten (Abb. 24B, C).

Es ist möglich, Tubulin aus dem Cytosol zu depletieren, indem nach Zugabe von Taxol das gesamte Tubulin in stabile Mikrotubuli assembliert wird, die durch Zentrifugation von dem restlichen Cytosol abgetrennt werden können. Eine andere Möglichkeit ist die Zugabe von Vinblastin zum Cytosol, das mit Tubulin große, kristalline Aggregate bildet, die ebenfalls vom restlichen Cytosol durch Zentrifugation abgetrennt werden können (Palacek et al., 1982). Durch einen quantitativen "Western Blot" wurde gezeigt, daß mit der ersten Methode 90-95% (Abb. 25D) und mit der zweiten Methode mehr als 95% des Tubulins aus dem Cytosol entfernt wurden (Daten nicht gezeigt). Diese Tubulin-depletierten Cytosole waren in der ER-Bildung genauso aktiv wie nicht-depletiertes Cytosol (Abb. 25A, B). Auch die Zugabe von Vinblastin zu dem mit der ersten Methode depletierten Cytosol hatte keinen erkennbaren Einfluß auf die ER-Bildung (Abb. 25C). Es ist anzumerken, daß es eine mit der Menge des im Cytosol vorhandenen Tubulins vergleichbare Menge in der Membranfraktion gibt (Daten nicht gezeigt). Dieses Tubulin ist offensichtlich fest an die Membran gebunden, da es trotz mehrmaligen Waschens membranassoziiert bleibt (Daten

Abb. 24. Reagenzien, die die Bildung von Mikrotubuli verhindern, hemmen die ER-Bildung nicht

(A) Colchicin (100 μ M) oder Nocodazol (0.2mg/ml) wurden zu der ER-Bildungsreaktion im Eiextrakt gegeben und die ER-Bildung wie in Abb. 13 analysiert.

(B und C) Zu einer ER-Bildungsreaktion mit den leichten Membranen und Cytosol wurden wie in (A) Nocodazol oder Colchicin gegeben und die ER-Bildung wie in Abb. 13 analysiert.

Maßstab: Schwarz-Weiß Bilder 10 μ m; Farbbilder 80 μ m.

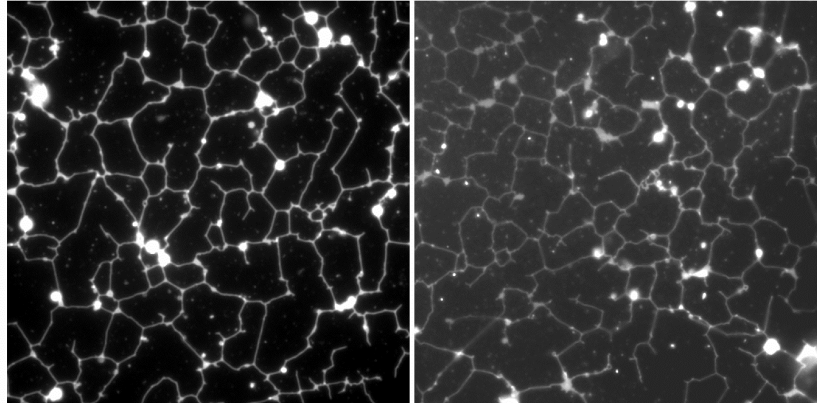
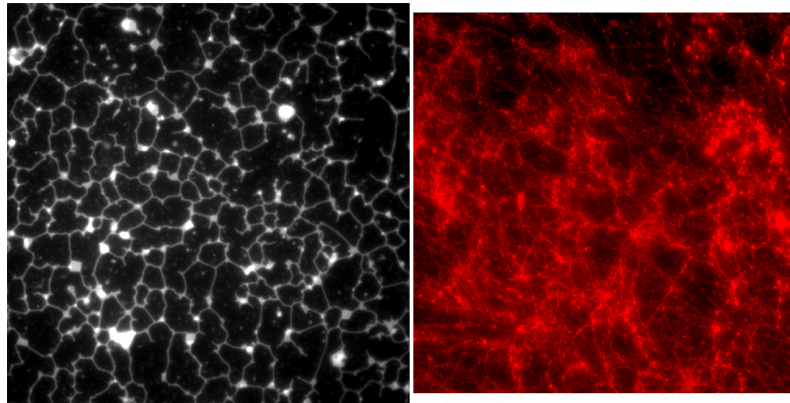
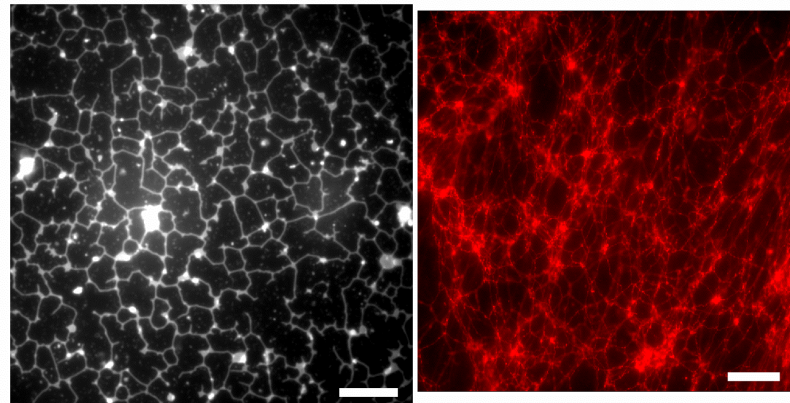
Abb. 24

A

Colchicin

Nocodazol

Eiextrakt

**B**Membranen
+
Cytosol
+
Nocodazol**C**Membranen
+
Cytosol
+
Colchicin

nicht gezeigt). Über die Funktion dieses membrangebundenen Tubulins ist nichts bekannt. Eine verbreitete Annahme ist, daß es sich lediglich um denaturiertes Tubulin handelt.

Zusammengefaßt wird die ER-Bildung durch Reagenzien, die die Bildung von Mikrotubuli verhindern, und durch das Entfernen von Tubulin aus dem Cytosol nicht beeinflusst. Diese Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß Mikrotubuli in diesem System nicht für die Bildung der Membrannetzwerke des ER notwendig sind; die Wechselwirkung zwischen den Mikrotubuli und den Membrantubuli kann jedoch unter bestimmten Bedingungen beobachtet werden.

3.2.7. Für die Aufrechterhaltung der Struktur der Membrantubuli ist eine Protease-sensitive Komponente notwendig

Die bisherigen Experimente machen es wahrscheinlich, daß ein Schritt bei der Bildung der Membrannetzwerke des ER die Fusion der kleinen Membranvesikel ist, und daß diese Fusion nach einem ähnlichen Mechanismus wie die anderer zellulärer Fusionsreaktionen abläuft. Nachdem gezeigt wurde, daß weder Mikrotubuli noch Actin-Filamente an der Netzbildung beteiligt sind, stellte sich die Frage, ob zusätzlich zur Fusion überhaupt ein weiterer Protein-vermittelter Prozeß an der Bildung der tubulären Membranstrukturen beteiligt ist. Hierfür spricht zwar, daß in Abwesenheit von Cytosol trotz der stattfindenden Membranfusion keine Netzwerke gebildet werden (Abb. 13C); da jedoch die durch Fusion in Abwesenheit von Cytosol entstandenen großen, kugelförmigen Membranvesikel bei nachträglicher Zugabe von Cytosol keine tubulären Strukturen mehr bilden, können diese beiden Schritte bei der ER-Bildung nicht getrennt untersucht werden. Es ist jedoch möglich zu testen, ob nach der Bildung der Membrannetzwerke Proteine zur Aufrechterhaltung der tubulären Membranstrukturen notwendig sind. Dazu wurden die Netzwerke wie üblich

Abb. 25. Die Depletion von Tubulin aus dem Cytosol hemmt die ER-Bildung nicht

Tubulin wurde durch die Zugabe von kurzen Mikrotubuli und Taxol (A, Methode 1) oder mit Hilfe von Vinblastin (B, Methode 2) aus dem Cytosol depletiert und das depletierte Cytosol wie in Abb. 13 in der ER-Bildungsreaktion getestet.

(C) Zu dem mit Methode 1 depletierten Cytosol wurde Vinblastin (200 μ M) gegeben und dieses Cytosol wie in Abb. 13 in der ER-Bildungsreaktion getestet.

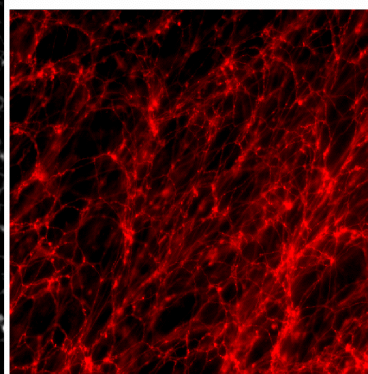
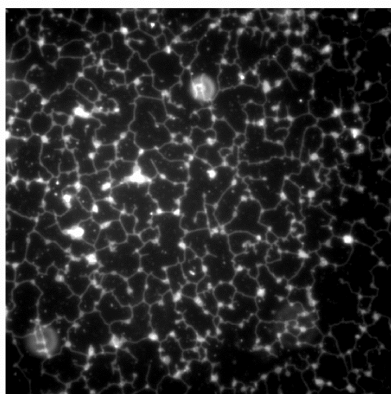
(D) Die Depletion des Cytosols wurde im "Western Blot" bestimmt. In dem in (A) verwendeten Cytosol waren etwa 93% des Tubulins aus dem Cytosol entfernt, in dem in (B) verwendeten Cytosol mehr als 95% (nicht gezeigt).

Maßstab: Schwarz-Weiß Bilder 10 μ m, Farbbilder 80 μ m.

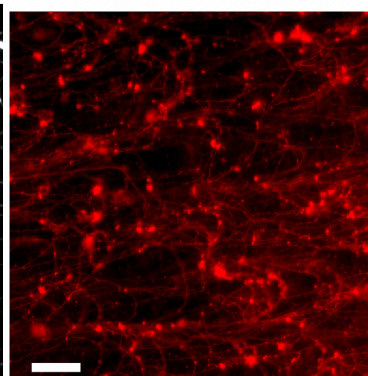
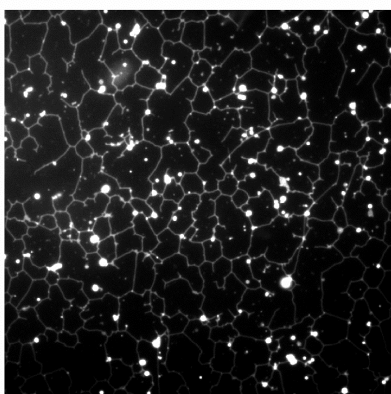
Abb. 25

A

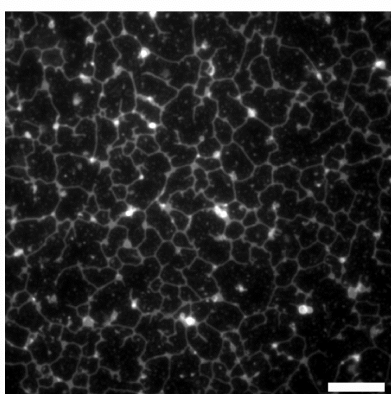
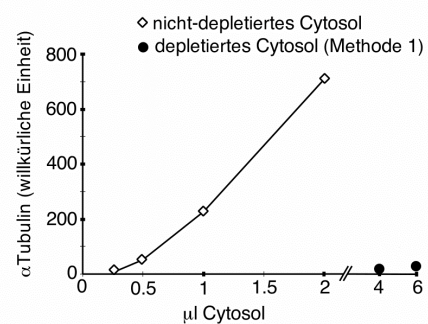
Tubulin-
depletiertes
Cytosol
(Methode 1)

**B**

Tubulin-
depletiertes
Cytosol
(Methode 2)

**C**

Tubulin-
depletiertes
Cytosol
(Methode 1)
+
Vinblastin

**D**

gebildet und anschließend mit Proteinase K, einer relativ unspezifischen Protease, inkubiert. Nach 5-15 Minuten Inkubation mit der Protease vergrößert sich der Durchmesser der Membrantubuli dramatisch (Abb. 18C). Es scheint demnach ein Protein zur Aufrechterhaltung der dünnen Membrantubuli notwendig zu sein, das durch Proteinase K inaktiviert wird, so daß die Membrantubuli spontan eine andere Form annehmen. Die Wirkung der Proteinase K ist ähnlich der von nachträglich zugegebenen Ca^{2+} (vergleiche Abb. 18C mit Abb. 18B).

3.2.8. Erste Fraktionierungen der für die ER-Bildung notwendigen cytosolischen Aktivitäten

Für die ER-Bildung in diesem System werden ein oder mehrere Faktoren aus dem Cytosol benötigt. Da das Cytosol nicht für die Fusion der Membranvesikel notwendig ist, handelt es sich bei diesen cytosolischen Faktoren wahrscheinlich nicht um Proteine einer allgemeinen Fusionsmaschinerie. Ebenso kann es sich bei der cytosolischen Aktivität auch nicht um Tubulin, Actin oder Tubulin- oder Actin-assoziierte Proteine handeln, da weder Mikrotubuli noch Actin-Filamente für die ER-Bildung notwendig sind. Somit gibt es keine offensichtlichen guten Kandidaten für die cytosolische Aktivität und damit auch nicht die Möglichkeit, einzelne Proteine zum Beispiel durch Antikörper aus dem Cytosol zu entfernen und die Wirkung auf die ER-Bildung zu beobachten, oder Kandidatenproteine anstelle des Cytosols mit den Membranen zu inkubieren.

Eine Möglichkeit zur Identifizierung beteiligter Faktoren ist stattdessen, das Cytosol zu fraktionieren und die an der ER-Bildung beteiligten Aktivitäten zu reinigen. Wie schon bei der Kernbildung erwähnt, ist es für die Reinigung dieser cytosolischen Aktivitäten ideal, einen quantifizierbaren Prozeß zu untersuchen, in dem die Aktivitäten noch in hoher Verdünnung bestimmt werden können, und Ausgangsmaterial in großen Mengen zur Verfügung zu haben.

Das Cytosol kann bis zu vierfach verdünnt werden, bevor die Aktivität merklich abnimmt. Bei einer 10fachen Verdünnung bilden sich nur noch sehr wenige Membrantubuli (Daten nicht gezeigt). Eine exakte Quantifizierung der Aktivität ist nicht möglich, aber die Verdünnung, bis zu der die ER-Bildung noch nicht merklich abnimmt, gibt ein Maß für die Konzentration der Aktivität. Eine Reihe von Cytosolen aus verschiedenen Organismen und Geweben wurden auf ihre Aktivität bei der ER-Bildung getestet. Cytosole aus *Xenopus laevis*-Leber und Rinderpankreas waren ähnlich aktiv wie das Cytosol aus dem Eiextrakt, während Cytosole von *S.cerevisiae* und aus Weizenkeimen keine Aktivität besaßen (Daten nicht gezeigt). *Xenopus*-Leber oder Rinderpankreas stehen als Ausgangsmaterial zur Fraktionierung in großer Menge zur Verfügung.

Schließlich wurden zwei verschiedene Fraktionierungen des aus dem Eiextrakt hergestellten Cytosols getestet. Die durch eine Gelfiltration erhaltenen Fraktionen wurden durch SDS-PAGE und Färben mit "Coomassie-Blau" analysiert (Abb. 26A). Nach Aufkonzentrierung wurden die Fraktionen in der ER-Bildungsreaktion getestet. Die Aktivität für die ER-Bildung wurde hauptsächlich in zwei aufeinanderfolgenden Fraktionen wiedergefunden (Abb. 26B). Ein Vergleich mit Standardproteinen zeigt, daß in diesen Fraktionen Proteine mit einem Molekulargewicht von etwa 50kDa zu finden sind. Die cytosolischen Aktivitäten für die ER-Bildung konnten außerdem bei einer Salzkonzentration von 50 mM Kaliumacetat an eine DEAE-Anionenaustauschersäule gebunden werden und eluierten mit 150 mM Kaliumacetat (Daten nicht gezeigt). Der Durchlauf sowie Fraktionen, die mit höheren Salzkonzentrationen eluiert wurden, zeigten keine ER-Bildungsaktivität.

Zusammengenommen zeigen diese Ergebnisse, daß es gute Voraussetzungen gibt, eine oder mehrere Aktivitäten aus dem Cytosol durch Fraktionierung zu reinigen.

Abb. 26

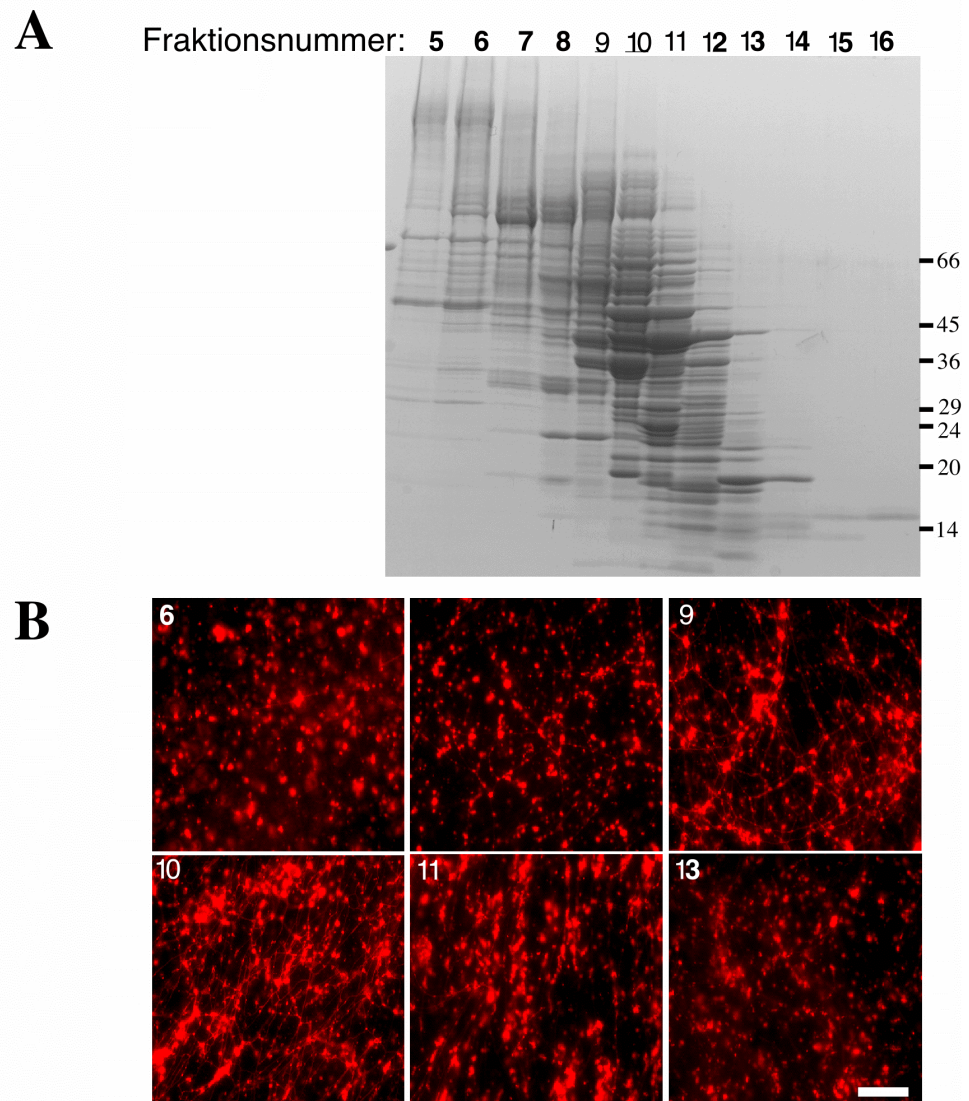


Abb. 26. Fraktionierung der cytosolischen Aktivität für die Bildung der Membrantubuli durch Gelfiltration

(A) 1ml Cytosol wurde mit einer Superose12 Gelfiltrationssäule aufgetrennt und durch SDS-PAGE und Färben der Proteine mit "Coomassie Blau" analysiert. An der rechten Seite sind die Positionen und Molekulargewichte von Markerproteinen (in kDa) angegeben.

(B) Die Fraktionen der Gelfiltration wurden nach Aufkonzentrieren in der ER-Bildungsreaktion getestet. Die Nummern in der linken, oberen Ecke der Bilder geben die Fraktionsnummer an. Die Aktivität für die ER-Bildung befand sich in den Fraktionen 9 und 10. Maßstab: 80µm.

4. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurden die Mechanismen der Bildung der Zellkernhülle und der Membrannetzwerke des ER in einem zellfreien System untersucht.

Die ER-Bildung *in vitro*

Die in diesem *in vitro* System gebildeten Membrannetzwerke des ER haben eine erstaunliche Ähnlichkeit mit den polygonen Netzwerken des ER in der Peripherie eukaryontischer Zellen. Die Membrantubuli haben im EM-Bild einen Durchmesser von etwa 100nm, vergleichbar mit dem Durchmesser von Membrantubuli des ER in anderen *in vitro* Systemen (Dabora und Sheetz, 1988; Allan und Vale, 1994). Dies ist etwas größer als der Durchmesser der Membrantubuli des ER und die Dicke von Membranzisternen des ER in Zellen, die zwischen 30nm und 70nm liegen. Die Ursache für den Unterschied ist nicht klar. Es scheint jedoch angesichts der großen Ähnlichkeit der *in vitro* gebildeten Netzwerkstrukturen mit dem ER der Zelle wahrscheinlich, daß das in dieser Arbeit entwickelte *in vitro* System die ER-Bildung in Zellen reproduziert.

Die ER-Bildung weist Eigenschaften eines Protein-vermittelten, energieabhängigen Prozesses auf. Die Proteasebehandlung der Membranen sowie die Depletion von ATP verhindern die Bildung. Bei der ER-Bildung können zwei Schritte unterschieden werden: Die Fusion kleiner Membranvesikel und ein Cytosol-abhängiger Schritt, der für die Bildung der Membrantubuli notwendig ist. Die Hemmung der Netzworkebildung durch NEM und GTP γ S könnte durch die Inaktivierung von bekannten Komponenten einer allgemeinen Fusionsmaschinerie verursacht sein. Ohne Cytosol erfolgt eine effiziente Fusion der Membranvesikel, durch die sich jedoch keine Membrantubuli und Netzwerke bilden, sondern große, kugelförmige Vesikel. Wird zu einer solchen Reaktion nachträglich Cytosol gegeben, so bilden sich keine Netzwerke mehr. Dies bedeutet zum einen, daß die cytosolische Aktivität, die für die Bildung der Netzwerke verantwortlich ist, während der Fusion wirken muß. Zum anderen bestätigt es die Annahme, daß die Membranvesikel, die

die Netzwerke bilden können, in Abwesenheit von Cytosol zu großen Vesikeln fusioniert sind. Denn würden sie in Abwesenheit von Cytosol nicht fusioniert sein, gäbe es keinen Grund, warum sie bei nachträglicher Zugabe des Cytosols keine Netzwerke mehr bilden können.

Die Interaktion der in diesem *in vitro* System gebildeten Membrantubuli des ER mit Mikrotubuli konnte unter Bedingungen, die Mikrotubuli stabilisieren, beobachtet werden. Membrantubuli und Mikrotubuli können über mehrere Mikrometer, auch über Knotenpunkte hinweg, zusammen laufen. Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit den zahlreichen Untersuchungen zur ER-Bildung in Zellkulturzellen und *in vitro* Systemen, in denen beobachtet wurde, wie sich Membrantubuli des ER entlang von Mikrotubuli bilden und bewegen. Überraschenderweise kann Bildung von Mikrotubuli in dem von uns entwickelten *in vitro* System verhindert werden, ohne daß die ER-Bildung beeinflußt wird. Dies wurde mit Hilfe von Reagenzien, die zur Depolymerisation der Mikrotubuli führen, und durch das Entfernen von Tubulin aus dem Cytosol gezeigt. Es muß also alternative, Mikrotubuli-unabhängige Mechanismen zur Bildung der Membrannetzwerke des ER geben. Die beobachtete Interaktion der Mikrotubuli mit den Membrantubuli des ER kann auf die Rolle der Mikrotubuli bei der Verteilung des ER in der Zelle zurückzuführen sein. Danach könnten zum Plusende der Mikrotubuli gerichtete Motorproteine, wie z.B. Kinesine, an spezifische Rezeptoren der ER-Membran binden und die Membrannetzwerke entlang der Mikrotubuli in die Zellperipherie bewegen. Interessanterweise hat die Depolymerisation der Mikrotubuli keinen Einfluß auf die Membrannetzwerke des peripheren ER in *S.cerevisiae*. Eine Ursache hierfür könnte sein, daß die Hefezelle mit einem Durchmesser von etwa 5µm wesentlich kleiner ist, als höhere eukaryontische Zellen mit Durchmessern bis zu 50µm, und daher andere Mechanismen zur Lokalisation des peripheren ER benutzt.

Actin-Filamente sind ebenfalls nicht für die ER-Bildung notwendig, da Reagenzien, die zur Depolymerisation der Actin-Filamente führen, die Netzwerkbildung nicht beeinflussen.

Mögliche Mechanismen zur Bildung der Membrantubuli des ER

Zunächst sprechen einige Ergebnisse dagegen, daß bei der Bildung der Membrantubuli die miteinander fusionierten Membranvesikel einfach unabhängig von Proteinen eine energetisch günstige Struktur annehmen. Ohne Cytosol entstehen durch die Fusion der Membranvesikel nicht Membrantubuli, sondern große, kugelförmige Vesikel. Werden die gebildeten Membrannetzwerke mit Proteinase K behandelt, so vergrößern die dünnen Membrantubuli ihren Durchmesser deutlich. Schließlich sind die auf der Glasoberfläche eines Objektträgers gebildeten Membrannetzwerke in Puffer nur für kurze Zeit stabil.

Die Beteiligung von Intermediärfilamenten an der ER-Bildung wurde in dieser Arbeit nicht ausgeschlossen; in Zellkulturzellen wurde jedoch keine Interaktion zwischen Membranen des ER und dem Intermediärfilament-Protein Vimentin beobachtet (Lee et al., 1989). Es ist vorstellbar, daß Strukturproteine, die die Membrantubuli an der Außenseite umschließen, durch ihre eigene Krümmung der Membran ihre Form aufzwingen. Ein Beispiel für ein solches "Membranskelett" ist das von den Proteinen Spectrin und Ankyrin gebildete zweidimensionale Netzwerk, das der Plasmamembran von Zellen unterliegt. Am besten ist das Spectrin/Ankyrin-Netzwerk in Erythrocyten untersucht. Spectrin bildet Tetramere mit einer Länge von 200nm, die miteinander über kurze Actin-Filamente vernetzt und über Ankyrin an die Plasmamembran gebunden sind. Ankyrin ist ein peripheres Membranprotein, das in Erythrocyten an das integrale Membranprotein "Bande 3" bindet und in anderen Zellen unter anderem an die Na^+/K^+ -ATPase der Plasmamembran. Das Spectrin/Ankyrin-Netzwerk gibt Erythrocyten mechanische Stabilität und ist an der Bildung der charakteristischen konkaven Form beteiligt. Menschen mit genetisch bedingten Veränderungen des Spectrins haben kugelförmige Erythrocyten, die sehr fragil sind. Ein dem Spectrin/Ankyrin-Netzwerk ähnliches Membranskelett könnte an der Bildung der Membranstrukturen des ER beteiligt sein. Vor kurzem wurden homologe Proteine von Spectrin und Ankyrin auf der Membran des Golgi-Apparates gefunden, die in großen Proteinkomplexen vorliegen (Beck et al., 1994; Devarajan et al., 1996; Beck et al., 1997). Unter Bedingungen, die zur Deassemblierung des Golgi-Apparates führen, z.B. während der Mitose oder nach Behandlung von Zellen mit

Brefeldin A, dissoziiert das Golgi-Spectrin und -Ankyrin von der Membran. Werden Golgi-Spectrin und -Ankyrin jedoch durch die Expression eines veränderten Golgi-Spectrins in der Zelle vom Golgi-Apparat dissoziiert, so beeinflußt dies die Struktur des Golgi-Apparates nicht (Devarajan et al., 1997). Stattdessen wird der Transport einiger Membranproteine vom ER zum Golgi-Apparat verhindert.

Bei der Bildung der Membrantubuli des ER könnten Filament-bildende Proteine eine Rolle spielen, die das Innere der Membrantubuli oder der abgeflachten Membranzisternen des ER oder Golgi-Apparates durchspannen und gegenüberliegende Seiten der Membran verbinden. Die Länge der Proteinfilamente würde den Durchmesser der Membrantubuli bzw. den Abstand der Membranen abgeflachter Membranzisternen bestimmen, und könnte gut den gleichmäßigen Durchmesser dieser Strukturen erklären. Für die Existenz von Filament-Strukturen im Inneren membranumschlossener Organellen gibt es keine experimentellen Hinweise. Die Sensitivität der Membrantubuli gegenüber der von der cytosolischen Seite einwirkenden Proteinase K spricht eher dafür, daß vom Cytosol zugängliche Proteine auf der Außenseite der Membranen für die Aufrechterhaltung der Struktur der Membrantubuli verantwortlich sind.

Darüberhinaus ist die Form eines Membranvesikels abhängig von einer Reihe physikalischer Parameter, die unter Berücksichtigung physiologischer Bedingungen die Bildung tubulärer Membranstrukturen favorisieren können (Mui et al., 1995; Chou et al., 1997; Sciaky et al., 1997). Zunächst bestimmt das Verhältnis vom Volumen zur Oberfläche die Form eines Membranvesikels. Durch Ionenkanäle können Ionen aus einem Vesikel hinaus oder in ein Vesikel hinein transportiert werden. Dies kann die Osmolarität im Inneren des Membranvesikels verändern und zu einer Veränderung des Volumens und somit zu einer Änderung der Form des Vesikels führen. Ein kugelförmiges Membranvesikel könnte beispielsweise durch die Verringerung seines Volumens eine tubuläre Form annehmen.

Jedes Verhältnis von Volumen zu Oberfläche, das kleiner als das einer Kugel ist, kann durch eine unendlich große Zahl von Formen des Membranvesikels, unter anderem auch

tubuläre Strukturen, realisiert werden. Welche Form ein Membranvesikel tatsächlich annimmt, ob zum Beispiel eine eher kugelförmige oder tubuläre, könnte dann von der bevorzugten Oberflächenkrümmung der Lipidmembran abhängen, da die unterschiedlichen Formen mit gleichem Verhältnis von Volumen zu Oberfläche eine sehr unterschiedliche Krümmung ihrer Oberfläche aufweisen können. Große, kugelförmige Membranvesikel, die sich in Abwesenheit von Cytosol bilden, haben eine geringere Krümmung, als die dünnen Membrantubuli des ER. Die bevorzugte Krümmung eines Membranvesikels kann von vielen Parametern abhängen. Eine Erhöhung der Zahl der Lipidmoleküle in der äußeren Membranschicht führt dazu, daß ein Membranvesikel eine Form mit stärkerer Krümmung einnimmt (Mui et al., 1995). Eine Erniedrigung bewirkt das Gegenteil und kann z.B. zur Einstülpung der Membranvesikel führen. In der Zelle könnten Flippasen, die den Wechsel eines Lipidmoleküls von einer Seite der Lipiddoppelschicht zur anderen katalysieren, oder Lipidtransfer-Proteine, die Lipide binden und sie in die äußere Schicht einer Lipidmembran einfügen oder aus dieser entfernen, diese Veränderungen bewirken. Über die Beteiligung von Flippasen wurde bei dem Wechsel zwischen zwei Formen des Erythrocyten, vom Echinocyten zum Discocyten, spekuliert (Artmann et al., 1997).

Außerdem kann die Form der Lipidmoleküle oder der integralen Membranproteine in der Lipidmembran einen Einfluß auf die bevorzugte Krümmung haben (Schekman und Orci, 1996). Während Lipide wie Dioleat-Phosphatidylcholin eine zylindrische Form haben, da ihre polare Kopfgruppe einen annähernd gleichen lateralen Durchmesser wie ihre Acylketten hat, ist Cholesterin mehr keilförmig, da dessen Hydroxyl-Kopfgruppe einen kleineren Durchmesser als der hydrophobe Teil hat. Eine Erhöhung der Cholesterinmenge in der äußeren Membranschicht bewirkt somit eine bevorzugte geringere Krümmung des Membranvesikels. Die Form eines Lipidmoleküls kann durch das Abspalten einer Fettsäure durch eine Phospholipase verändert werden. Interessanterweise stimuliert das an dem Vesikeltransport vom ER zum Golgi-Apparat und innerhalb des Golgi-Apparates beteiligte Protein "ADP-ribosylation factor", ARF, die Phospholipase D und bewirkt dadurch die Bildung der Transportvesikel (Brown et al., 1993; Ktistakis et al., 1996). Ein denkbarer Mechanismus ist, daß das Abspalten von Fettsäuren die Krümmung der Membran beim Abschnüren des Transportvesikels bewirkt oder erleichtert.

Elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den Kopfgruppen der Lipide können auch einen Einfluß auf die bevorzugte Krümmung haben, da in einer gekrümmten Membran der Abstand zwischen den Kopfgruppen der Lipide der äußeren Lipidschicht ein anderer ist, als der Lipide der inneren Lipidschicht. Sind die elektrostatischen Wechselwirkungen auf den Seiten der Lipidmembran unterschiedlich, z.B. dadurch, daß auf der einen Seite positiv geladene Proteine binden und auf der anderen einfach geladene Kationen, so kann dies zur Änderung der Krümmung des Membranvesikels führen (Chou et al., 1997). Ähnlich wirkt die Phosphorylierung der Inositol-Gruppe von Phosphatidyl-Inositol durch spezifische Proteinkinasen (PI-Kinasen). Die Phosphorylierung der Lipide auf einer Seite der Lipidmembran führt zu einer größeren Abstoßung zwischen den Kopfgruppen dieser Seite. PI-Kinasen spielen unter anderem eine Rolle beim Vesikeltransport vom Trans-Golgi-Netzwerk und bei der Endocytose. Die Phosphorylierung von Phosphatidyl-Inositol könnte dabei die Krümmung der Lipidmembran beim Abschüren von Transportvesikeln erleichtern (de Camilli et al., 1996).

In vielen eukaryontischen Zellen wirken wahrscheinlich Mikrotubuli-abhängige und -unabhängige Mechanismen zusammen, um die Bildung und Aufrechterhaltung des ER zu bewerkstelligen. Welche der oben aufgeführten Mikrotubuli-unabhängigen Mechanismen tatsächlich für die ER-Bildung in diesem System und damit in eukaryontischen Zellen eine Rolle spielen, wird am besten durch die Identifizierung der beteiligten Faktoren geklärt werden. Einen ersten Schritt in diese Richtung stellt das in dieser Arbeit etablierte *in vitro* System dar, da es im Gegensatz zu allen bisher beschriebenen *in vitro* Systemen der ER-Bildung keine Mikrotubuli und damit auch keine Mikrotubuli-abhängigen Faktoren benötigt. Dies sollte die Identifizierung der Mikrotubuli-unabhängigen Faktoren durch Fraktionierung des Cytosols erleichtern. Die ersten Ergebnisse von Fraktionierungen des Cytosols unterstützen diese Annahme.

Die Rolle von Ca^{2+} bei der ER-Bildung

Die ER-Bildung wird in diesem System durch Ca^{2+} in einer Konzentration von 1mM verhindert. Die Zugabe von Ca^{2+} zu bereits gebildeten Membrannetzwerken führt, ähnlich wie die Behandlung mit Proteinase K, zu einer Vergrößerung des Durchmessers der Membrantubuli. Ähnlich bewirkt die Behandlung von Zellkulturzellen mit Calcium-Ionophoren in Gegenwart von 1mM Ca^{2+} im extrazellulären Medium, daß das ER in kleine Vesikel fragmentiert (Koch et al., 1988; Subramanian und Meyer, 1997). Die Fragmentierung in Zellen ist reversibel und möglicherweise spezifisch für das ER, da die Kernhülle bei der Behandlung intakt bleibt. Leider wurden andere Membranstrukturen, wie z.B. der Golgi-Apparat in diesen Arbeiten nicht analysiert. Die Ursache für die Wirkung von Ca^{2+} auf das ER *in vivo* und die ER-Bildung *in vitro* ist nicht bekannt. Überraschenderweise benötigt die Neubildung des durch die Behandlung mit Calcium-Ionophoren deassemblierten ER Ca^{2+} im extrazellulären Medium und kann durch die Behandlung der Zellen mit Calciumkanal-Inhibitoren verhindert werden (Koch et al., 1988). Eine mögliche Erklärung hierfür ist, daß Ca^{2+} in niedrigen Konzentrationen im Cytosol für die Bildung des ER notwendig ist und in hohen Konzentrationen zur Deassemblierung führt. Interessanterweise ist über die Beteiligung des Calcium-bindenden Proteins Calmodulin an der Bildung tubulärer Membranstrukturen in der Zelle spekuliert worden (de Figueiredo und Brown, 1995). Calmodulin-Inhibitoren verhinderten die Bildung der Membrantubuli des Golgi-Apparates, die bei der Behandlung von Zellkulturzellen mit Brefeldin A auftreten. Wird Ca^{2+} , vielleicht zusammen mit Calmodulin, von der Zelle benutzt, um das ER in regulierter Weise zu bilden und zu deassemblieren, zum Beispiel bei der Fragmentierung des ER in der Mitose oder wenn die Zelle bei der Zellwanderung ihre Form ändert? Calcium wird von der Zelle als "second messenger" für eine Vielzahl von Signaltransduktions-Prozessen verwendet. Ca^{2+} /Calmodulin kann z.B. an Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Kinasen binden und diese dadurch aktivieren. Interessanterweise wurde in einem *in vitro* System zur ER-Bildung beschrieben, daß Phosphatase-Inhibitoren die ER-Bildung stimulieren (Allen, 1995). Also könnten Phosphorylierungen durch Proteinkinasen die Bildung des ER stimulieren. In dem in dieser Arbeit etablierten *in vitro* System wurden drei verschiedene Calmodulin-Inhibitoren auf ihre Wirkung bei der ER-Bildung getestet. Vorläufige Ergebnisse zeigen, daß zwei der drei getesteten Inhibitoren bei relativ hohen Konzentrationen die ER-Bildung

verhindern (Daten nicht gezeigt). Eine Rolle von Ca^{2+} /Calmodulin bei der ER-Bildung *in vitro* ist allerdings fraglich, da der Calcium-Chelator EGTA im meiotischen Cytosol die ER-Bildung nicht hemmt.

Die ER-Bildung unter mitotischen Bedingungen

Wie ist das unterschiedliche Ausmaß der Deassemblierung des ER in verschiedenen Zelltypen während der Mitose zu erklären? Eine Antwort wird erst durch die Identifizierung der beteiligten Faktoren möglich sein. In dem hier vorgestellten *in vitro* System wurde mit zwei unterschiedlich hergestellten mitotischen/meiotischen Cytosolen eine unterschiedlich effiziente Bildung des ER beobachtet. Während mit dem "meiotischen" Cytosol die Membrannetzwerke genauso effizient wie mit dem Interphasen-Cytosol gebildet wurden, wurden mit dem durch Cyclin B hergestellten mitotischen Extrakt deutlich weniger Netzwerke erhalten. Die Netzwerke waren außerdem "grobmaschiger", d.h. sie besaßen weniger Knotenpunkte. Eine genaue Quantifizierung dieses Unterschiedes ist jedoch schwer möglich. Beide Cytosole besaßen eine hohe Histon H1-Kinase Aktivität und bildeten keine Zellkerne in Gegenwart von Spermien-Chromatin. Sie erfüllen damit eindeutige Kriterien für einen mitotischen Zustand. Es könnte sein, daß das unterschiedliche Ausmaß der ER-Bildung *in vitro* mit dem unterschiedlichen Ausmaß der Deassemblierung des ER in verschiedenen Zelltypen in der Mitose in Zusammenhang steht.

Viele Fusionsreaktionen zwischen Membranen kommen in der Mitose zum Erliegen. Es ist also unerwartet, daß sich unter mitotischen Bedingungen *in vitro* überhaupt Membrannetzwerke bilden können, da dies die Fusion von Membranvesikeln voraussetzt. In einer Arbeit, die die typische Fusionsreaktion zwischen frühen Endosomen quantitativ und in Abhängigkeit von Interphasen-Cytosol und mitotischem Cytosol bestimmt hat, war jedoch die Fusion in Gegenwart von mitotischem Cytosol nur um etwa 50% reduziert (Tuomikosky et al., 1989). Eine solche Reduktion der ER-Bildung wäre in dem hier verwendeten *in vitro* System nicht sicher zu detektieren. Die Fusionseffizienz der frühen

Endosomen nahm mit steigender Histon H1-Kinaseaktivität des Cytosols durch die Zugabe von gereinigter CDC2/Cyclin B-Kinase ab. Da die Histon H1-Kinaseaktivität des mit Cyclin B hergestellten mitotischen Cytosols etwa doppelt so hoch wie die des "meiotischen" Cytosols war, könnte dies eine Erklärung für das unterschiedliche Ausmaß der ER-Bildung bieten. Es könnte natürlich auch sein, daß in dem mitotischen Zustand andere an der ER-Bildung beteiligte Proteine aktiviert oder inaktiviert sind als in dem meiotischen Zustand, und dadurch die beobachteten Unterschiede entstehen.

Vor kurzem wurde gezeigt, daß eine MAP(Mitogen aktivierte Protein)-Kinase-Kinase, MEK1, für die Deassemblierung des Golgi-Apparates in der Mitose in einem permeabilisierten Zellsystem notwendig ist (Acharya et al., 1998). Als potentiell Substrat dieser Kinase wurde eine MAP-Kinase auf der Membran des Golgi-Apparates identifiziert. Da der Golgi-Apparat, wie auch das ER, nicht in allen Zelltypen in der Mitose deassembliert, wurde spekuliert, daß die Zelltypen, in denen der Golgi-Apparat nicht deassembliert, auch nicht die mit dem Golgi-Apparat assoziierte MAP-Kinase besitzen (Stanley et al., 1997; Acharya et al., 1998). Ob MAP-Kinasen an der Deassemblierung des ER in der Mitose beteiligt sind, ist nicht bekannt.

Die Bildung der Zellkernhülle

Der *X.laevis* Eiextrakt kann in eine cytosolische und zwei Membranfraktionen getrennt werden. Die leichte Membranfraktion enthält die Membranen des ER und bildet zusammen mit Cytosol die polygonen Membrannetzwerke. Membranvesikel aus dieser Fraktion binden an das Chromatin und bilden zusammen mit dem Cytosol kleine Zellkerne. Für die Bildung großer Zellkerne, wie sie in dem unfractionierten Extrakt entstehen, ist zusätzlich die schwere Membranfraktion notwendig, die keine ER-Membranen enthält, selber nicht ans Chromatin binden kann und zusammen mit dem Cytosol keine Zellkerne bildet. Es ist möglich, daß Membranvesikel der schweren Membranfraktion mit der äußeren Kernhülle fusionieren, und so zum Wachstum der Kernhülle beitragen. Dies würde bedeuten, daß Membranen mit der Kernhülle fusionieren, die nicht ER-Membranen sind. Andererseits

könnte der Effekt der schweren Membranfraktion auch indirekt durch die in dieser Fraktion stark angereicherten Mitochondrien verursacht sein, die zum Beispiel aktiv Phosphat- und Calcium-Ionen aufnehmen können, und dadurch die Konzentrationen dieser Ionen im Cytosol verändern können. Für das Wachstum eines kleinen Zellkerns ist es wahrscheinlich notwendig, daß Membranen von der äußeren Kernmembran über die Verbindungen an den Kernporen zur inneren Kernmembran gelangen, damit auch diese mitwachsen kann. Die in Zellen beobachtete Größenveränderung des Zellkerns könnte nach einem ähnlichem Mechanismus wie die Größenzunahme der *in vitro* gebildeten Zellkerne ablaufen (Rosania und Swanson, 1995).

In dieser Arbeit wurde die Bildung der Zellkernhülle mit einer hochauflösenden CCD-Kamera verfolgt und die Qualität der erhalten Bilder durch anschließende Bildverarbeitung weiter verbessert. Mit dieser Technik können drei Schritte nach der Dekondensation des Chromatins unterschieden werden: Die Bindung von Membranvesikeln an das Chromatin, die Fusion der Chromatin-gebundenen Membranvesikel und das Abflachen der fusionierenden Membranvesikel auf der Oberfläche des Chromatins. Die Bindung der Membranvesikel benötigt kein Cytosol und keine Energie in Form von ATP. Die Fusion der Membranvesikel läuft wahrscheinlich nach einem ähnlichen Mechanismus ab, wie andere Fusionsreaktionen in der Zelle, da sie durch NEM und GTP γ S gehemmt werden kann. Offensichtlich sind alle für die Fusion notwendigen Faktoren in ausreichender Menge auf den Membranvesikeln vorhanden, da die Fusion auch in Abwesenheit von Cytosol stattfindet. Interessanterweise reicht die Fusion allein nicht für die Bildung einer Kernhülle aus. Durch die Fusion ohne Cytosol bilden sich stattdessen große, Chromatin-gebundene Membranvesikel, die eine kugelförmige Gestalt behalten, statt flach auf der Oberfläche des Chromatins zu liegen. Für das Abflachen der Membranvesikel auf der Oberfläche des Chromatins sind eine oder mehrere cytosolische Aktivitäten notwendig. In der vereinfachten Kernbildungsreaktion sind nach zehn Minuten die Chromatin-gebundenen Membranvesikel bereits zum Teil miteinander fusioniert. In Gegenwart von Cytosol liegen die resultierenden größeren Membranvesikel flach auf der Oberfläche des Chromatins und sind manchmal durch dünne Membrantubuli verbunden. Im Verlauf der Reaktion wird die von den abgeflachten Membranvesikeln bedeckte Oberfläche des

Chromatins wahrscheinlich durch die weitere Fusion mit Membranvesikeln größer, bis sich schließlich eine geschlossene Kernhülle bildet. Zu keinem Zeitpunkt sind am Chromatin große, kugelförmige Membranvesikel, vergleichbar mit den in Abwesenheit von Cytosol gebildeten, zu sehen. Wird Cytosol nachträglich zu einer Kernbildungsreaktion gegeben, bei der bereits große, fusionierte Membranvesikel am Chromatin gebunden sind, so flachen diese Membranvesikel nicht mehr ab und es bildet sich keine Kernhülle. Das Cytosol enthält demnach Faktoren, die während der Fusion der Membranvesikel das Abflachen auf der Chromatinoberfläche bewirken.

Die Parallelen zwischen der Bildung der Kernhülle und der Bildung der Membrannetzwerke des ER sind auffällig. Sowohl die Kernhülle als auch die Membrantubuli des ER werden durch die Fusion kleiner Membranvesikel der gleichen leichten Membranfraktion gebildet. Die Fusion ist unabhängig von Cytosol, jedoch allein nicht für die Bildung der abgeflachten Kernhülle und der Membrantubuli des ER ausreichend. Stattdessen werden in beiden Fällen große, kugelförmige Membranvesikel gebildet. Nur in Gegenwart von Cytosol werden die jeweiligen Membranstrukturen gebildet. Die nachträgliche Zugabe von Cytosol zu großen Membranvesikeln, die durch die Fusion kleiner Membranvesikel in Abwesenheit von Cytosol entstanden sind, ist hierfür nicht ausreichend. Bei der Bildung der Kernhülle im vereinfachten *in vitro* System sind in frühen Stadien nicht nur kleine Membranflächen, sondern auch Membrantubuli auf der Chromatinoberfläche zu sehen. Membrantubuli wurden ebenfalls bei der Reassemblierung der Kernhülle auf der Oberfläche der getrennten Chromosomen am Ende der Mitose in Zellkulturzellen beobachtet (Ellenberg et al., 1997). Angesichts der Ähnlichkeiten beider Prozesse ist es denkbar, daß der Bildung dieser Membranstrukturen ähnliche Mechanismen zugrunde liegen.

Daher könnten die Mechanismen, über die bereits bei der Bildung der Membrantubuli des ER spekuliert wurde, auch für das Abflachen der Kernhülle verantwortlich sein. Wie bei den Membrantubuli des ER könnten Filamentstrukturen im Innern der Kernhülle, die die innere und äußere Kernmembran miteinander verbinden, durch ihre Länge den Abstand zwischen innerer und äußerer Kernmembran vorgeben. Auch ein äußeres Membranskelett

wie das Spectrin/Ankyrin-Netzwerk ist denkbar. Eine Verringerung des inneren Volumens hätte zur Folge, daß ein Membranvesikel, das vorher rund war, eine flachere Form annehmen kann, da hierdurch bei gleicher Oberfläche das Volumen geringer wird.

Darüberhinaus gibt es einige speziell für das Abflachen der Kernhülle denkbare Mechanismen. Die Kernporen könnten die innere und äußere Kernmembran zusammenhalten. Dagegen spricht, daß *in vitro* Zellkerne mit normaler Kernhülle, aber völlig ohne Kernporen, gebildet werden können. Dies wird durch die Zugabe des Calcium-Chelators BAPTA (1,2-bis-(o-Aminophenoxy)-ethan-N,N,N',N'-tetra-ethansäure) zu einer Kernbildungsreaktion im *Xenopus in vitro* System erreicht, wobei der Wirkungsmechanismus von BAPTA nicht verstanden ist (Macaulay und Forbes, 1996). Außerdem ist vorstellbar, daß Chromatin-bindende Proteine eines großen Membranvesikels so weit verteilt auf der Oberfläche des Chromatins binden, daß die dem Chromatin abgewandte Seite des Membranvesikels nur noch flach zur anderen Seite verlaufen kann. Dies sollte jedoch auch in Abwesenheit von Cytosol geschehen, da die Bindung der Membranvesikel an das Chromatin Cytosol-unabhängig ist. Denkbar wäre auch, daß Chromatin-bindende Motorproteine ein Membranvesikel, das an einer Stelle des Chromatins gebunden ist, entlang der Oberfläche des Chromatins ziehen, und so das Abflachen erreichen.

Um den Mechanismus des Abflachens der Kernmembran zu verstehen, ist es notwendig, die beteiligten cytosolischen Faktoren zu identifizieren. Hierfür stellt die vereinfachte Kernbildungsreaktion einen ersten Schritt dar. Die in diesem System gebildeten Zellkerne bleiben klein, bilden aber eine geschlossene Kernhülle mit innerer und äußerer Kernmembran. Im vereinfachten Kernbildungssystem erfolgt die Dekondensation des Chromatins durch Polyglutamat, und Kernimport ist nicht erforderlich. Da außerdem die Fusion der Chromatin-gebundenen Membranvesikel unabhängig vom Cytosol ist, ist es wahrscheinlich, daß das Cytosol nur die Faktoren, die für das Abflachen der fusionierenden Membranvesikel notwendig sind, bereitstellen muß. Das Ergebnis der Fraktionierung mittels Anionenaustauscher-Chromatographie zeigt, daß es möglich ist, die

Aktivität des Cytosols, die das Abflachen der Membranvesikel bei der Bildung der Kernhülle bewirkt, zu fraktionieren.

Cytosolische Faktoren, die in einem der beiden in dieser Arbeit entwickelten *in vitro* Systeme identifiziert werden, sollten Hinweise auf den Mechanismus der Bildung der jeweiligen Membranstruktur geben und können leicht auf ihre Funktion in dem anderen System getestet werden. Sie sollten Aufschluß darüber geben, ob ähnliche Mechanismen bei der Bildung der Kernhülle und der Membrantubuli des ER, sowie anderer ähnlicher Membranstrukturen der Zelle, wie z.B. der abgeflachten Membranzisternen des ER und des Golgi-Apparates oder der Membrantubuli des Cis- und Trans-Golgi-Netzwerkes eine Rolle spielen.

5. Literaturverzeichnis

- Acharya, U., Jacobs, R., Peters, J. M., Watson, N., Farquhar, M. G. and Malhotra, V. (1995). The formation of Golgi stacks from vesiculated Golgi membranes requires two distinct fusion events. *Cell* 82, 895-904.
- Acharya, U., McCaffery, J. M., Jacobs, R. and Malhotra, V. (1995). Reconstitution of vesiculated Golgi membranes into stacks of cisternae: requirement of NSF in stack formation. *J Cell Biol* 129, 577-89.
- Acharya, U., Mallabiabarrena, A., Acharya, J. K. and Malhotra, V. (1998). Signaling via mitogen-activated protein kinase kinase (MEK1) is required for Golgi fragmentation during mitosis. *Cell* 92, 183-92.
- Aebi, U., Cohn, J., Buhle, L. and Gerace, L. (1986). The nuclear lamina is a meshwork of intermediate-type filaments. *Nature* 323, 560-4.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Watson, J.D. (1994). *Molecular Biology of the Cell*. 3rd edition, New York, Garland Publishing.
- Allan, V. J. and Vale, R. D. (1991). Cell cycle control of microtubule-based membrane transport and tubule formation in vitro. *J Cell Biol* 113, 347-59.
- Allan, V. and Vale, R. (1994). Movement of membrane tubules along microtubules in vitro: evidence for specialised sites of motor attachment. *J Cell Sci* 107, 1885-97.
- Allan, V. (1995). Protein phosphatase 1 regulates the cytoplasmic dynein-driven formation of endoplasmic reticulum networks in vitro. *J Cell Biol* 128, 879-91.
- Appelbaum, J., Blobel, G. and Georgatos, S. D. (1990). In vivo phosphorylation of the lamin B receptor. Binding of lamin B to its nuclear membrane receptor is affected by phosphorylation. *J Biol Chem* 265, 4181-4184.
- Artmann, G. M., Sung, K. L., Horn, T., Whittemore, D., Norwich, G. and Chien, S. (1997). Micropipette aspiration of human erythrocytes induces echinocytes via membrane phospholipid translocation. *Biophys J* 72, 1434-41.
- Ayscough, K. R., Stryker, J., Pokala, N., Sanders, M., Crews, P. and Drubin, D. G. (1997). High rates of actin filament turnover in budding yeast and roles for actin in establishment and maintenance of cell polarity revealed using the actin inhibitor latrunculin-A. *J Cell Biol* 137, 399-416.
- Beck, K. A., Buchanan, J. A., Malhotra, V. and Nelson, W. J. (1994). Golgi spectrin: identification of an erythroid beta-spectrin homolog associated with the Golgi complex. *J Cell Biol* 127, 707-23.
- Beck, K. A., Buchanan, J. A. and Nelson, W. J. (1997). Golgi membrane skeleton: identification, localization and oligomerization of a 195 kDa ankyrin isoform associated with the Golgi complex. *J Cell Sci* 110, 1239-49.
- Belmont, L. D., Hyman, A. A., Sawin, K. E. and Mitchison, T. J. (1990). Real-time visualization of cell cycle-dependent changes in microtubule dynamics in cytoplasmic extracts. *Cell* 62, 579-89.
- Bloom, G. S. and Goldstein, L. S. B. (1998). Cruising along microtubule highways: how membranes move through the secretory pathway. *J Cell Biol* 140, 1277-80.

- Blow, J. J. and Laskey, R. A. (1986). Initiation of DNA replication in nuclei and purified DNA by a cell-free extract of *Xenopus* eggs. *Cell* 47, 577-87.
- Boman, A. L., Delannoy, M. R. and Wilson, K. L. (1992). GTP hydrolysis is required for vesicle fusion during nuclear envelope assembly in vitro. *J Cell Biol* 116, 281-94.
- Brown, H. A., Gutowski, S., Moomaw, C. R., Slaughter, C. and Sternweis, P. C. (1993). ADP-ribosylation factor, a small GTP-dependent regulatory protein, stimulates phospholipase D activity. *Cell* 75, 1137-44.
- Burke, B. and Gerace, L. (1986). A cell free system to study reassembly of the nuclear envelope at the end of mitosis. *Cell* 44, 639-52.
- Cameron, L. A. and Poccia, D. L. (1994). In vitro development of the sea urchin male pronucleus. *Dev Biol* 162, 568-78.
- Chou, T., Jaric, M. V. and Siggia, E. D. (1997). Electrostatics of lipid bilayer bending. *Biophys J* 72, 2042-55.
- Cole, N. B., Sciaky, N., Marotta, A., Song, J. and Lippincott-Schwartz, J. (1996). Golgi dispersal during microtubule disruption: regeneration of Golgi stacks at peripheral endoplasmic reticulum exit sites. *Mol Biol Cell* 7, 631-50.
- Collas, P., Pinto-Correia, C. and Poccia, D. L. (1995). Lamin dynamics during sea urchin male pronuclear formation in vitro. *Exp Cell Res* 219, 687-98.
- Collas, P. and Poccia, D. (1996). Distinct egg membrane vesicles differing in binding and fusion properties contribute to sea urchin male pronuclear envelopes formed in vitro. *J Cell Sci* 109, 1275-83.
- Collas, P., Courvalin, J. C. and Poccia, D. (1996). Targeting of membranes to sea urchin sperm chromatin is mediated by a lamin B receptor-like integral membrane protein. *J Cell Biol* 135, 1715-25.
- Courvalin, J. C., Segil, N., Blobel, G. and Worman, H. J. (1992). The lamin B receptor of the inner nuclear membrane undergoes mitosis-specific phosphorylation and is a substrate for p34cdc2-type protein kinase. *J Biol Chem* 267, 19035-8.
- Dabauvalle, M. C., Loos, K., Merkert, H. and Scheer, U. (1991). Spontaneous assembly of pore complex-containing membranes ("annulate lamellae") in *Xenopus* egg extract in the absence of chromatin. *J Cell Biol* 112, 1073-82.
- Dabora, S. L. and Sheetz, M. P. (1988). The microtubule-dependent formation of a tubulovesicular network with characteristics of the ER from cultured cell extracts. *Cell* 54, 27-35.
- Dasso, M., Dimitrov, S. and Wolffe, A. P. (1994). Nuclear assembly is independent of linker histones. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 12477-81.
- Dasso, M., Seki, T., Azuma, Y., Ohba, T. and Nishimoto, T. (1994). A mutant form of the Ran/TC4 protein disrupts nuclear function in *Xenopus laevis* egg extracts by inhibiting the RCC1 protein, a regulator of chromosome condensation. *Embo J* 13, 5732-44.
- De Camilli, P., Emr, S. D., McPherson, P. S. and Novick, P. (1996). Phosphoinositides as regulators in membrane traffic. *Science* 271, 1533-9.
- de Figueiredo, P. and Brown, W. J. (1995). A role for calmodulin in organelle membrane tubulation. *Mol Biol Cell* 6, 871-87.

- Dessev, G., Iovcheva-Dessev, C., Bischoff, J. R., Beach, D. and Goldman, R. (1991). A complex containing p34cdc2 and cyclin B phosphorylates the nuclear lamin and disassembles nuclei of clam oocytes in vitro. *J Cell Biol* 112, 523-33.
- Devarajan, P., Stabach, P. R., Mann, A. S., Ardito, T., Kashgarian, M. and Morrow, J. S. (1996). Identification of a small cytoplasmic ankyrin (AnkG119) in the kidney and muscle that binds beta I sigma spectrin and associates with the Golgi apparatus. *J Cell Biol* 133, 819-30.
- Devarajan, P., Stabach, P. R., De Matteis, M. A. and Morrow, J. S. (1997). Na,K-ATPase transport from endoplasmic reticulum to Golgi requires the Golgi spectrin-ankyrin G119 skeleton in Madin Darby canine kidney cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 10711-6.
- Dimitrov, S., Dasso, M. C. and Wolffe, A. P. (1994). Remodeling sperm chromatin in *Xenopus laevis* egg extracts: the role of core histone phosphorylation and linker histone B4 in chromatin assembly. *J Cell Biol* 126, 591-601.
- Dingwall, C., Dilworth, S. M., Black, S. J., Kearsey, S. E., Cox, L. S. and Laskey, R. A. (1987). Nucleoplasmin cDNA sequence reveals polyglutamic acid tracts and a cluster of sequences homologous to putative nuclear localization signals. *Embo J* 6, 69-74.
- Doree, M. and Galas, S. (1994). The cyclin-dependent protein kinases and the control of cell division. *Faseb J* 8, 1114-21.
- Ellenberg, J., Siggia, E. D., Moreira, J. E., Smith, C. L., Presley, J. F., Worman, H. J. and Lippincott-Schwartz, J. (1997). Nuclear membrane dynamics and reassembly in living cells: targeting of an inner nuclear membrane protein in interphase and mitosis. *J Cell Biol* 138, 1193-206.
- Ellis, D. J., Jenkins, H., Whitfield, W. G. and Hutchison, C. J. (1997). GST-lamin fusion proteins act as dominant negative mutants in *Xenopus* egg extract and reveal the function of the lamina in DNA replication. *J Cell Sci* 110, 2507-18.
- Forbes, D. J., Kirschner, M. W. and Newport, J. W. (1983). Spontaneous formation of nucleus-like structures around bacteriophage DNA microinjected into *Xenopus* eggs. *Cell* 34, 13-23.
- Gerace, L. and Burke, B. (1988). Functional organization of the nuclear envelope. *Annu Rev Cell Biol* 4, 335-74.
- Goldberg, M., Jenkins, H., Allen, T., Whitfield, W. G. and Hutchison, C. J. (1995). *Xenopus* lamin B3 has a direct role in the assembly of a replication competent nucleus: evidence from cell-free egg extracts. *J Cell Sci* 108, 3451-61.
- Görlich, D., Prehn, S., Hartmann, E., Herz, J., Otto, A., Kraft, R., Wiedmann, M., Knespel, S., Dobberstein, B. and Rapoport, T. A. (1990). The signal sequence receptor has a second subunit and is part of a translocation complex in the endoplasmic reticulum as probed by bifunctional reagents. *J Cell Biol* 111, 2283-94.
- Görlich, D. and Rapoport, T. A. (1993). Protein translocation into proteoliposomes reconstituted from purified components of the endoplasmic reticulum membrane. *Cell* 75, 615-30.
- Gorvel, J. P., Chavrier, P., Zerial, M. and Gruenberg, J. (1991). rab5 controls early endosome fusion in vitro. *Cell* 64, 915-25.
- Harada, A., Takei, Y., Kanai, Y., Tanaka, Y., Nonaka, S. and Hirokawa, N. (1998). Golgi vesiculation and lysosome dispersion in cells lacking cytoplasmic dynein [In Process Citation]. *J Cell Biol* 141, 51-9.

- Hartl, P., Olson, E., Dang, T. and Forbes, D. J. (1994). Nuclear assembly with lambda DNA in fractionated *Xenopus* egg extracts: an unexpected role for glycogen in formation of a higher order chromatin intermediate. *J Cell Biol* 124, 235-48.
- Hay, J. C. and Scheller, R. H. (1997). SNAREs and NSF in targeted membrane fusion. *Curr Opin Cell Biol* 9, 505-12.
- Hirokawa, N. (1998). Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. *Science* 279, 519-26.
- Holloway, S. L., Glotzer, M., King, R. W. and Murray, A. W. (1993). Anaphase is initiated by proteolysis rather than by the inactivation of maturation-promoting factor. *Cell* 73, 1393-402.
- Hyman, A., Drechsel, D., Kellogg, D., Salser, S., Sawin, K., Steffen, P., Wordeman, L. and Mitchison, T. (1991). Preparation of modified tubulins. *Methods Enzymol* 196, 478-85.
- Kalies, K. U. and Hartmann, E. (1996). Membrane topology of the 12- and the 25-kDa subunits of the mammalian signal peptidase complex. *J Biol Chem* 271, 3925-9.
- Kessel, R. G. (1992). Annulate lamellae: a last frontier in cellular organelles. *Int Rev Cytol* 133, 43-120.
- Kitten, G. T. and Nigg, E. A. (1991). The CaaX motif is required for isoprenylation, carboxyl methylation, and nuclear membrane association of lamin B2. *J Cell Biol* 113, 13-23.
- Klausner, R. D., Donaldson, J. G. and Lippincott-Schwartz, J. (1992). Brefeldin A: insights into the control of membrane traffic and organelle structure. *J Cell Biol* 116, 1071-80.
- Kleinschmidt, J. A., Seiter, A. and Zentgraf, H. (1990). Nucleosome assembly in vitro: separate histone transfer and synergistic interaction of native histone complexes purified from nuclei of *Xenopus laevis* oocytes. *Embo J* 9, 1309-18.
- Koch, G. L., Booth, C. and Wooding, F. B. (1988). Dissociation and re-assembly of the endoplasmic reticulum in live cells. *J Cell Sci* 91, 511-22.
- Kondo, H., Rabouille, C., Newman, R., Levine, T. P., Pappin, D., Freemont, P. and Warren, G. (1997). p47 is a cofactor for p97-mediated membrane fusion. *Nature* 388, 75-8.
- Kornbluth, S., Dasso, M. and Newport, J. (1994). Evidence for a dual role for TC4 protein in regulating nuclear structure and cell cycle progression. *J Cell Biol* 125, 705-19.
- Kornbluth, S., Dasso, M. and Newport, J. (1994). Evidence for a dual role for TC4 protein in regulating nuclear structure and cell cycle progression. *J Cell Biol* 125, 705-19.
- Krohne, G. and Benavente, R. (1986). The nuclear lamins. A multigene family of proteins in evolution and differentiation. *Exp Cell Res* 162, 1-10.
- Ktistakis, N. T., Brown, H. A., Waters, M. G., Sternweis, P. C. and Roth, M. G. (1996). Evidence that phospholipase D mediates ADP ribosylation factor- dependent formation of Golgi coated vesicles. *J Cell Biol* 134, 295-306.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-5.
- Laskey, R. A., Mills, A. D. and Morris, N. R. (1977). Assembly of SV40 chromatin in a cell-free system from *Xenopus* eggs. *Cell* 10, 237-43.

- Latterich, M. and Schekman, R. (1994). The karyogamy gene KAR2 and novel proteins are required for ER-membrane fusion. *Cell* 78, 87-98.
- Latterich, M., Frohlich, K. U. and Schekman, R. (1995). Membrane fusion and the cell cycle: Cdc48p participates in the fusion of ER membranes. *Cell* 82, 885-93.
- Lee, C. and Chen, L. B. (1988). Dynamic behavior of endoplasmic reticulum in living cells. *Cell* 54, 37-46.
- Lee, C., Ferguson, M. and Chen, L. B. (1989). Construction of the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 109, 2045-55.
- Lippincott-Schwartz, J., Cole, N. B., Marotta, A., Conrad, P. A. and Bloom, G. S. (1995). Kinesin is the motor for microtubule-mediated Golgi-to-ER membrane traffic. *J Cell Biol* 128, 293-306.
- Lippincott-Schwartz, J. (1998). Cytoskeletal proteins and Golgi dynamics. *Curr Opin Cell Biol* 10, 52-9.
- Lohka, M. J. and Masui, Y. (1983). Formation in vitro of sperm pronuclei and mitotic chromosomes induced by amphibian ooplasmic components. *Science* 220, 719-21.
- Lohka, M. J. and Masui, Y. (1984). Roles of cytosol and cytoplasmic particles in nuclear envelope assembly and sperm pronuclear formation in cell-free preparations from amphibian eggs. *J Cell Biol* 98, 1222-30.
- Lohka, M. J. and Maller, J. L. (1985). Induction of nuclear envelope breakdown, chromosome condensation, and spindle formation in cell-free extracts. *J Cell Biol* 101, 518-23.
- Longo, F. J., and Kunkle, M. (1978). Transformation of sperm nuclei upon insemination. *Curr Topics Dev Biol* 12, 149-184.
- Lourim, D. and Krohne, G. (1993). Membrane-associated lamins in *Xenopus* egg extracts: identification of two vesicle populations. *J Cell Biol* 123, 501-12.
- Lourim, D., Kempf, A. and Krohne, G. (1996). Characterization and quantitation of three B-type lamins in *Xenopus* oocytes and eggs: increase of lamin LI protein synthesis during meiotic maturation. *J Cell Sci* 109, 1775-85.
- Luscher, B., Brizuela, L., Beach, D. and Eisenman, R. N. (1991). A role for the p34cdc2 kinase and phosphatases in the regulation of phosphorylation and disassembly of lamin B2 during the cell cycle. *Embo J* 10, 865-75.
- Macaulay, C., Meier, E. and Forbes, D. J. (1995). Differential mitotic phosphorylation of proteins of the nuclear pore complex. *J Biol Chem* 270, 254-62.
- Macaulay, C. and Forbes, D. J. (1996). Assembly of the nuclear pore: biochemically distinct steps revealed with NEM, GTP gamma S, and BAPTA. *J Cell Biol* 132, 5-20.
- Marshall, I. C. B., and Wilson, K. L. (1997). Nuclear envelope assembly after mitosis. *Trends Cell Biol* 7, 69-74.
- Meier, J., Campbell, K. H., Ford, C. C., Stick, R. and Hutchison, C. J. (1991). The role of lamin LIII in nuclear assembly and DNA replication, in cell-free extracts of *Xenopus* eggs. *J Cell Sci* 98, 271-9.

- Meier, E., Miller, B. R. and Forbes, D. J. (1995). Nuclear pore complex assembly studied with a biochemical assay for annulate lamellae formation. *J Cell Biol* 129, 1459-72.
- Miake-Lye, R. and Kirschner, M. W. (1985). Induction of early mitotic events in a cell-free system. *Cell* 41, 165-75.
- Moos, J., Xu, Z., Schultz, R. M. and Kopf, G. S. (1996). Regulation of nuclear envelope assembly/disassembly by MAP kinase. *Dev Biol* 175, 358-61.
- Mui, B. L., Dobereiner, H. G., Madden, T. D. and Cullis, P. R. (1995). Influence of transbilayer area asymmetry on the morphology of large unilamellar vesicles. *Biophys J* 69, 930-41.
- Murray, A. W., Solomon, M. J. and Kirschner, M. W. (1989). The role of cyclin synthesis and degradation in the control of maturation promoting factor activity. *Nature* 339, 280-6.
- Murray, A. W. (1991). Cell Cycle Extracts. *Methods Cell Biol* 36, 581-605.
- Müsch, A., Cohen, D. and Rodriguez-Boulán, E. (1997). Myosin II is involved in the production of constitutive transport vesicles from the TGN. *J Cell Biol* 138, 291-306.
- Newmeyer, D. D. and Wilson, K. L. (1991). Egg extracts for nuclear import and nuclear assembly reactions. *Methods Cell Biol* 36, 607-34.
- Newport, J. and Spann, T. (1987). Disassembly of the nucleus in mitotic extracts: membrane vesicularization, lamin disassembly, and chromosome condensation are independent processes. *Cell* 48, 219-30.
- Newport, J. (1987). Nuclear reconstitution in vitro: stages of assembly around protein-free DNA. *Cell* 48, 205-17.
- Newport, J. W. and Forbes, D. J. (1987). The nucleus: structure, function, and dynamics. *Annu Rev Biochem* 56, 535-65.
- Newport, J. W., Wilson, K. L. and Dunphy, W. G. (1990). A lamin-independent pathway for nuclear envelope assembly. *J Cell Biol* 111, 2247-59.
- Newport, J. and Dunphy, W. (1992). Characterization of the membrane binding and fusion events during nuclear envelope assembly using purified components. *J Cell Biol* 116, 295-306.
- Nigg, E. A. (1992). Assembly and cell cycle dynamics of the nuclear lamina. *Semin Cell Biol* 3, 245-53.
- Nishimoto, T., Uzawa, S. and Schlegel, R. (1992). Mitotic checkpoints. *Curr Opin Cell Biol* 4, 174-9.
- Novick, P. and Zerial, M. (1997). The diversity of Rab proteins in vesicle transport. *Curr Opin Cell Biol* 9, 496-504.
- Palecek, J., Ubbels, G. A. and Macha, J. (1982). An immunocytochemical method for the visualization of tubulin-containing structures in the egg of *Xenopus laevis*. *Histochemistry* 76, 527-38.
- Patel, S. K., Indig, F. E., Olivieri, N., Levine, N. D. and Latterich, M. (1998). Organelle membrane fusion: a novel function for the syntaxin homolog Ufe1p in ER membrane fusion. *Cell* 92, 611-20.
- Pfaller, R., Smythe, C. and Newport, J. W. (1991). Assembly/disassembly of the nuclear envelope membrane: cell cycle-dependent binding of nuclear membrane vesicles to chromatin in vitro. *Cell* 65, 209-17.

- Pfaller, R. and Newport, J. W. (1995). Assembly/disassembly of the nuclear envelope membrane. Characterization of the membrane-chromatin interaction using partially purified regulatory enzymes. *J Biol Chem* 270, 19066-72.
- Philpott, A., Leno, G. H. and Laskey, R. A. (1991). Sperm decondensation in *Xenopus* egg cytoplasm is mediated by nucleoplasmin. *Cell* 65, 569-78.
- Philpott, A. and Leno, G. H. (1992). Nucleoplasmin remodels sperm chromatin in *Xenopus* egg extracts. *Cell* 69, 759-67.
- Powers, M. A., Macaulay, C., Masiarz, F. R. and Forbes, D. J. (1995). Reconstituted nuclei depleted of a vertebrate GLFG nuclear pore protein, p97, import but are defective in nuclear growth and replication. *J Cell Biol* 128, 721-36.
- Pugh, G. E., Coates, P. J., Lane, E. B., Raymond, Y. and Quinlan, R. A. (1997). Distinct nuclear assembly pathways for lamins A and C lead to their increase during quiescence in Swiss 3T3 cells. *J Cell Sci* 110, 2483-93.
- Pyrpasopoulou, A., Meier, J., Maison, C., Simos, G. and Georgatos, S. D. (1996). The lamin B receptor (LBR) provides essential chromatin docking sites at the nuclear envelope. *Embo J* 15, 7108-19.
- Rabouille, C., Misteli, T., Watson, R. and Warren, G. (1995a). Reassembly of Golgi stacks from mitotic Golgi fragments in a cell-free system. *J Cell Biol* 129, 605-18.
- Rabouille, C., Levine, T. P., Peters, J. M. and Warren, G. (1995b). An NSF-like ATPase, p97, and NSF mediate cisternal regrowth from mitotic Golgi fragments. *Cell* 82, 905-14.
- Rabouille, C., Kondo, H., Newman, R., Hui, N., Freemont, P. and Warren, G. (1998). Syntaxin 5 is a common component of the NSF- and p97-mediated reassembly pathways of Golgi cisternae from mitotic Golgi fragments in vitro. *Cell* 92, 603-10.
- Robinson, L., Aniento, F. and Gruenberg, J. (1997). NSF is required for transport from early to late endosomes. *J Cell Sci* 110, 2079-87.
- Rosania, G. R. and Swanson, J. A. (1995). Effects of macromolecular crowding on nuclear size. *Exp Cell Res* 218, 114-22.
- Rothman, J. E. and Warren, G. (1994). Implications of the SNARE hypothesis for intracellular membrane topology and dynamics. *Curr Biol* 4, 220-33.
- Rothman, J. E. (1994). Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature* 372, 55-63.
- Rothman, J. E. and Wieland, F. T. (1996). Protein sorting by transport vesicles. *Science* 272, 227-34.
- Rybin, V., Ullrich, O., Rubino, M., Alexandrov, K., Simon, I., Seabra, C., Goody, R. and Zerial, M. (1996). GTPase activity of Rab5 acts as a timer for endocytic membrane fusion. *Nature* 383, 266-9.
- Schekman, R. and Orci, L. (1996). Coat proteins and vesicle budding. *Science* 271, 1526-33.
- Schmidt, M. and Krohne, G. (1995). In vivo assembly kinetics of fluorescently labeled *Xenopus* lamin A mutants. *Eur J Cell Biol* 68, 345-54.

- Sciaky, N., Presley, J., Smith, C., Zaal, K. J., Cole, N., Moreira, J. E., Terasaki, M., Siggia, E. and Lippincott-Schwartz, J. (1997). Golgi tubule traffic and the effects of brefeldin A visualized in living cells. *J Cell Biol* 139, 1137-55.
- Shamu, C. E. and Murray, A. W. (1992). Sister chromatid separation in frog egg extracts requires DNA topoisomerase II activity during anaphase. *J Cell Biol* 117, 921-34.
- Simos, G. and Georgatos, S. D. (1992). The inner nuclear membrane protein p58 associates in vivo with a p58 kinase and the nuclear lamins. *Embo J* 11, 4027-36.
- Smith, S. and Blobel, G. (1994). Colocalization of vertebrate lamin B and lamin B receptor (LBR) in nuclear envelopes and in LBR-induced membrane stacks of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 10124-8.
- Sogaard, M., Tani, K., Ye, R. R., Geromanos, S., Tempst, P., Kirchhausen, T., Rothman, J. E. and Sollner, T. (1994). A rab protein is required for the assembly of SNARE complexes in the docking of transport vesicles. *Cell* 78, 937-48.
- Söllner, T., Whiteheart, S. W., Brunner, M., Erdjument-Bromage, H., Geromanos, S., Tempst, P. and Rothman, J. E. (1993). SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* 362, 318-24.
- Song, J., Lee, C., Lin, C. H. and Chen, L. B. (1991). Electron microscopic studies of the endoplasmic reticulum in whole-mount cultured cells fixed with potassium permanganate. *J Struct Biol* 107, 106-15.
- Stanley, H., Botas, J. and Malhotra, V. (1997). The mechanism of Golgi segregation during mitosis is cell type-specific. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 14467-70.
- Steffen, W., Karki, S., Vaughan, K. T., Vallee, R. B., Holzbaur, E. L., Weiss, D. G. and Kuznetsov, S. A. (1997). The involvement of the intermediate chain of cytoplasmic dynein in binding the motor complex to membranous organelles of *Xenopus* oocytes. *Mol Biol Cell* 8, 2077-88.
- Subramanian, K. and Meyer, T. (1997). Calcium-induced restructuring of nuclear envelope and endoplasmic reticulum calcium stores. *Cell* 89, 963-71.
- Takizawa, P. A., Yucel, J. K., Veit, B., Faulkner, D. J., Deerinck, T., Soto, G., Ellisman, M. and Malhotra, V. (1993). Complete vesiculation of Golgi membranes and inhibition of protein transport by a novel sea sponge metabolite, ilimaquinone. *Cell* 73, 1079-90.
- Terasaki, M., Chen, L. B. and Fujiwara, K. (1986). Microtubules and the endoplasmic reticulum are highly interdependent structures. *J Cell Biol* 103, 1557-68.
- Terasaki, M. (1989). Fluorescent labeling of endoplasmic reticulum. *Methods Cell Biol* 29, 125-35.
- Trieschmann, L., Alfonso, P. J., Crippa, M. P., Wolffe, A. P. and Bustin, M. (1995). Incorporation of chromosomal proteins HMG-14/HMG-17 into nascent nucleosomes induces an extended chromatin conformation and enhances the utilization of active transcription complexes. *Embo J* 14, 1478-89.
- Tuomikoski, T., Felix, M. A., Doree, M. and Gruenberg, J. (1989). Inhibition of endocytic vesicle fusion in vitro by the cell-cycle control protein kinase cdc2. *Nature* 342, 942-5.
- Turner, M. D., Plutner, H. and Balch, W. E. (1997). A Rab GTPase is required for homotypic assembly of the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 272, 13479-83.
- Ulitzur, N., Harel, A., Feinstein, N. and Gruenbaum, Y. (1992). Lamin activity is essential for nuclear envelope assembly in a *Drosophila* embryo cell-free extract. *J Cell Biol* 119, 17-25.

- Ulitzur, N., Harel, A., Goldberg, M., Feinstein, N. and Gruenbaum, Y. (1997). Nuclear membrane vesicle targeting to chromatin in a *Drosophila* embryo cell-free system. *Mol Biol Cell* 8, 1439-48.
- Vale, R. D. and Hotani, H. (1988). Formation of membrane networks in vitro by kinesin-driven microtubule movement. *J Cell Biol* 107, 2233-41.
- Vigers, G. P. and Lohka, M. J. (1991). A distinct vesicle population targets membranes and pore complexes to the nuclear envelope in *Xenopus* eggs. *J Cell Biol* 112, 545-56.
- Vigers, G. P. and Lohka, M. J. (1992). Regulation of nuclear envelope precursor functions during cell division. *J Cell Sci* 102, 273-84.
- Walter, P. and Blobel, G. (1983). Preparation of microsomal membranes for cotranslational protein translocation. *Methods Enzymol* 96, 84-93.
- Warren, G. (1993). Membrane partitioning during cell division. *Annu Rev Biochem* 62, 323-48.
- Waterman-Storer, C. M., Gregory, J., Parsons, S. F. and Salmon, E. D. (1995). Membrane/microtubule tip attachment complexes (TACs) allow the assembly dynamics of plus ends to push and pull membranes into tubulovesicular networks in interphase *Xenopus* egg extracts. *J Cell Biol* 130, 1161-9.
- Weidman, P. J., Melancon, P., Block, M. R. and Rothman, J. E. (1989). Binding of an N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein to Golgi membranes requires both a soluble protein(s) and an integral membrane receptor. *J Cell Biol* 108, 1589-96.
- Wiese, C. and Wilson, K. L. (1993). Nuclear membrane dynamics. *Curr Opin Cell Biol* 5, 387-94.
- Wilson, K. L. and Newport, J. (1988). A trypsin-sensitive receptor on membrane vesicles is required for nuclear envelope formation in vitro. *J Cell Biol* 107, 57-68.
- Wilson, K. L. (1995). NSF-independent fusion mechanisms. *Cell* 81, 475-7.
- Wilson, K. L., and Wiese, C. (1996). Reconstituting the nuclear envelope and endoplasmic reticulum in vitro. *Seminars Cell Dev Biol* 7, 487-496.
- Worman, H. J., Yuan, J., Blobel, G. and Georgatos, S. D. (1988). A lamin B receptor in the nuclear envelope. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 8531-4.
- Worman, H. J., Evans, C. D. and Blobel, G. (1990). The lamin B receptor of the nuclear envelope inner membrane: a polytopic protein with eight potential transmembrane domains. *J Cell Biol* 111, 1535-42.
- Yang, L., Guan, T. and Gerace, L. (1997). Integral membrane proteins of the nuclear envelope are dispersed throughout the endoplasmic reticulum during mitosis. *J Cell Biol* 137, 1199-210.
- Ye, Q. and Worman, H. J. (1994). Primary structure analysis and lamin B and DNA binding of human LBR, an integral protein of the nuclear envelope inner membrane. *J Biol Chem* 269, 11306-11.
- Ye, Q. and Worman, H. J. (1996). Interaction between an integral protein of the nuclear envelope inner membrane and human chromodomain proteins homologous to *Drosophila* HP1. *J Biol Chem* 271, 14653-6.

6. ANHANG

Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
ConA	Concanavalin A
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(β -aminoethyl-ether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EM-Bild	Elektronenmikroskopisches Bild
ER	Endoplasmatisches Reticulum
GTP	Guanosintriphosphat
GTP γ S	Guanosin 5'-O-(3-thio-triphosphat)
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
kDa	Kilodalton
LBR	Lamin B Rezeptor
Mab 414	Monoklonaler Antikörper gegen eine Gruppe von Kernporenproteinen
MWB	Membranen-Wasch-Puffer
NEM	N-ethylmaleimid
NP-40	Octylphenoxy-polyethoxy-ethanol
PI	Proteaseinhibitoren
PIPES	1,4-Piperazin-diethansulfonsäure
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RM	Rauhe Hundepankreas-Mikrosomen
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SP12	12 kDa Untereinheit der Signalpeptidase
Trap α	α -Untereinheit des "Translocon associated protein"
Trap β	β -Untereinheit des "Translocon associated protein"
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
WGA	Weizenkeim-Agglutinin

ERKLÄRUNG

Ich erkläre, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Lars Dreier

Boston, 5. Mai 1998

LEBENS LAUF

Lars Dreier, geboren am 16. Januar 1968 in Bremervörde

1987	Erwerb der allgemeinen Hochschulreife (Abitur) am Gymnasium Bremervörde
1987-1988	Grundwehrdienst bei der Bundeswehr
1988-1993	Studium der Biochemie an der Freien Universität Berlin
1993	Hochschulabschluß als Diplom-Biochemiker Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Tom Rapoport am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin zum Thema: "Untersuchungen zur Funktion des Trap-Komplexes"
seit 10/1993	Anfertigung der vorliegenden Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Tom Rapoport
10/1993 bis 01/1995	Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin in Berlin-Buch in der Abteilung "Molekulare Zellforschung"
seit 02/1995	Harvard Medical School, Department of Cell Biology, Boston, MA, USA

VERÖFFENTLICHUNGEN

Artikel:

Panzner S., **Dreier L.**, Hartmann E., Kostka S., Rapoport T.A.

Posttranslational protein transport in yeast reconstituted with a purified complex of Sec proteins and Kar2p.

Cell 81: 561-570, 1995

Panzner S., **Dreier L.**, Hartmann E., Kostka S., Rapoport T.A.

Posttranslational protein transport into the endoplasmic reticulum.

Cold Spring Harb Symp Quant Biol 60:31-40, 1995

Poster:

Panzner S., **Lars Dreier**, Kostka S., Hartmann E., Rapoport T.A.

The Sec-complex and Kar2p in posttranslational protein transport.

Gordon Conference, Cell Biology, Andover, New Hampshire, 1995

DANKSAGUNG

Ich möchte mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Rapoport bedanken.

Tom Rapoport möchte ich für die freundschaftliche und lehrreiche Zusammenarbeit danken.

Bei Angelika Wittstruck, Brigitte Nentwig, Donna Lizotte, Lara Sutherland, Linda Barenboim und Carol Sawyer bedanke ich mich für die vielen Hilfen im Laboralltag.

Enno Hartmann, Susanne Kostka und Regine Kraft danke ich für das Sequenzieren und Identifizieren vieler Proteine.

Maria Erickson danke ich für ihre große Hilfe bei der Elektronenmikroskopie und Tanja Civco für ihre ungeheuer hilfsbereite und freundliche Art beim Führen der Froscheinrichtung.